

DEĐIŐİK STRES KAYNAKLARINA MARUZ
BIRAKILAN SİVAS KANGAL BALIKLI
KAPLICA'DAKİ (CYPRİNİDAE)
BALIKLARDAN HSP 70
SAFLAŞTIRILMASI

ŞULE (OKAN) BOZKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
2010

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DEĞİŞİK STRES KAYNAKLARINA MARUZ BIRAKILAN SİVAS
KANGAL BALIKLI KAPLICA'DAKİ (CYPRİNİDAE)
BALIKLARDAN HSP 70 SAFLAŞTIRILMASI

ŞULE (OKAN) BOZKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. YUSUF TUTAR

SİVAS
2010

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Doç. Dr. Şenay ÇETİNUS



Üye Y. Doç. Dr. Şeker DAĞ



Üye (Danışman) Doç. Dr. Yusuf TUTAR



ONAY

Bu tez çalışması, 09/02/2010 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sezai ELAGÖZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 9 sayılı toplantısında kabul edilen ve Fen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

DEĞİŞİK STRES KAYNAKLARINA MARUZ BIRAKILAN SİVAS KANGAL BALIKLI KAPLICADA'KI (CYPRİNİDAE) BALIKLARDAN HSP 70 SAFLAŞTIRILMASI

ŞULE (OKAN) BOZKALE

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Yusuf TUTAR

2010, 75 sayfa

Ülkemizde Doktor Balıklar olarak tanınan balıklar, Cyprinidae'ya ait olan *Cyprinion macrostomus* ve *Garra rufa obtusa*'dır. 39 °C nin üzerindeki sıcak sularda balıkların yaşadığına dair bilgiler vardır. Kaplıcada ortalama sıcaklık yıl boyunca 35 °C dir. Bu ortamda birçok zorluk, yüksek basınç, düşük oksijen miktarı, aşırı sıcaklık, besin kıtlığı, ağır metaller ve enfeksiyon sürekli fizyolojik stres oluşturur.

Mutasyonlar veya çevresel stres, proteinlerde hasara neden olur. HSP70 stres altında proteinleri korur. Katlanmamış proteinlerin kümeleşmesini önler. Katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlar. Hsp70 proteinlerinin ısı şoku koruması, bazı proteinlerin organellere iletilmesi, sitozolde proteinlerin katlanmasına yardım gibi biyokimyasal fonksiyonları vardır. Bu işlemleri Hsp40 (ko-şaperon) ile etkileşimle gerçekleştirirler. Hsp70 proteinleri aynı zamanda polipeptitlerin kararlı konformasyona erişmesine de yardımcı olurlar. Hücre için hayati öneme sahip olan bu makro moleküller peptitlere bağlandıkları zaman ATP hidrolizlerini artırır ve peptitin üçüncül yapısını bulmasına yardım ederler. Aynı zamanda ATP hidrolizi de peptite bağlanmayı artırır.

Balıklı çermikte bulunan iki tür balığın stres faktörlerinden sürekli etkilenmesine rağmen hayatta kalmaları iyi bir model olacağı düşünülmüştür. Modelleme çalışmasının ilk amacı stres etmenlerin ve engelleyici faktörlerin tanınmasıdır.

Balıklardan Hsp70 DEAE ve jel geçirgenlik kromatografisi ile saflaştırıldı. Hsp70 in substrat katlama özelliği lüsiferaz ile luminometri kullanılarak tespit edildi. ATP hidroliz deneyleri için fosfata bağlı bir mekanizma seçildi. Hsp70 in ΔG değeri

balıklarda yaklaşık 30kj/mol olarak bulundu. Stres etkileri sonucunda balıklı kaplıcadaki *Garra rufa obtusa* ve *Cyprinion macrostomus* balıklarda Hsp70 miktarında artış gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Stres, nörodejeneratif hastalıklar, balık biyolojisi, ısı şok proteinleri, aging

ABSTRACT

ISOLATION OF HSP70 UNDER DIFFERENT STRESS FACTORS FROM SIVAS KANGAL HOT SPRING FISH SPECIES (CYPRINIDAE)

ŞULE (OKAN) BOZKALE

Master of Science Thesis, Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Yusuf TUTAR

2010, 75pages

Talented two fish so called "Doctor fish" in our country are *Cyprinion macrostomus* and *Garra rufa obtusa* from Cyprinidae. It was known that some fish species survive above 39 °C in hot waters. The mean temperature in the hot spring is around 35 °C. Several difficulties such as high altitude, hypoxia, temperature, food deprivation, heavy metals and infection may form physiological stress.

Mutations and environmental stress can cause damages in proteins. Hsp70 protects proteins under stress. It prevents aggregation of unfolded proteins. It maintains the equilibrium between unfolded and misfolded protein. Hsp70 has several functions such as heat shock protection, transportation of some proteins to organelles, assisting to protein folding in cytosol. It perform all these actions with the help of Hsp40 (co-chaperon). Hsp70 also helps polypeptides to reach their stable native conformational state. These macromolecules which are essential for cell increase ATP hydrolyses upon binding to substrates and help them to find its tertiary structure. By the same analogy, ATP hydrolyses increases peptide binding.

It is proposed that the two fish species are ideal model since they survive under constitutive stress. The first aim in modelling study is to identify stress and preventive factors.

Hsp70 from the two fish species was isolated by DEAE and gel permeation chromatography. Hsp70's substrat folding property was determined by employing luciferase and luminometry. A phosphate dependent mechanism for ATP hydrolysis experiments was selected. Hsp70 ΔG value of fish species was calculated as

30kj/mol. Stress factors caused *Garra rufa obtusa* ve *Cyprinion macrostomus* fish species a considerable increase at Hsp70 levels.

Keywords: Stress, neurodegenerative diseases, fish biology, heat shock protein, aging

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve çalışmalarımı yönlendiren tez danışmanım sayın Doç. Dr. Yusuf TUTAR'a;

Çalışmalarım süresince yardımlarından ötürü Murat ÖZDEMİR, Merve Gökşin KARAASLAN, Doç. Dr. Şenay ÇETİNUS, Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi Sevgi DURNA'ya;

Tez çalışmalarım için gerekli olan donanımın sağlandığı Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, finansal kaynakların sağlandığı CÜBAP'a;

Her zaman ve her konuda desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Zeynel BOZKALE ve aileme en içten duygularıyla,

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1.GİRİŞ.....	1
1.1.Sivas Kangal Balıklı Kaplıca'daki Balıklar	1
1.2. Cyprinidae.....	5
1.2.1. <i>Garra rufa obtusa</i> HECKEL. 1843.....	6
1.1.2. <i>Cyprinion Macrostomus</i> HECKEL, 1843.....	7
1.3.Hsp 70.....	8
1.3.1. Protein Katlanmaları (Folding).....	9
1.3.2.HSP (Heat Shock Protein) Ailesi.....	10
1.3.2.1.HSP 100.....	11
1.3.2.2.HSP 90.....	11
1.3.2.3.HSP 70.....	12
1.3.2.4.HSP 60.....	13
1.3.2.5.Küçük Isı Şok Proteinler (sHSP)	13
1.3.3.HSP 70 'in Yapısı.....	14
1.3.4.Şaperon Mekanizması.....	15
1.3.5.HSP70'in İzofomları.....	16
1.3.6.Hüresel Stres Cevabı	18
1.3.7.Isı Şok Proteinlerinin Görevleri.....	19
1.3.7.1.Isı Şok Proteinlerin Hücre Dışı Görevleri.....	19
1.3.7.2.Isı Şok Proteinlerin Hücre İçi Görevleri.....	19
1.3.8.Isı Şok Protein Gen Transkripsiyonu.....	20
1.3.9. Isı Şok Proteinleri ve Hastalıklardaki Rolü.....	21
1.3.9.1. Isı şok proteinleri ve Bağışıklık.....	21
1.3.9.2. Isı şok proteinleri ve Kanser.....	22
1.3.9.3. Isı şok proteinleri ve Kalp Hastalıkları	22
1.4.Protein Saflaştırma Amacı Ve Stratejisi.....	22
1.4.1.Protein Saflaştırmanın Amacı.....	23
1.4.2.Ön Hazırlıklar.....	24
1.4.2.1Kaynak Seçimi.....	24
1.4.2.2Protein Hakkındaki Bilgi Birikimi.....	24
1.4.3.Protein Saflaştırma Stratejisi	25
1.4.4.Aktivitenin Korunması.....	25
1.4.5.Stratejik Planlama.....	26
1.4.6.Kromatografi.....	28
1.4.6.1.İyon-Değişim Kromatografisi.....	28
1.4.6.2.Proteinlerin İyon-Değişim Kromatografisi İle Saflaştırılması	32
1.4.6.3.İyon Değiştiricinin Seçimi	32
1.4.6.4.Tampon Seçimi.....	33

1.4.6.5.Kolon Seçimi.....	33
1.4.6.6. Örnek Tatbiki Ve Elüsyon.....	34
1.4.6.7 Jel Geçirgenlik Kromatografisi.....	34
1.4.7.Elektroforez.....	35
1.4.7.1 SDS-gel elektroforezi.....	37
1.5.Moleküler Lüminesans Spektroskopisi.....	38
1.5.1 Floresans Spektroskopisi.....	39
1.5.2 Protein Floresansı.....	44
1.5.2.1 Triptofan ve Türevler	44
1.5.2.2 Diğer Doğal Floresanslar.....	45
1.5.3.Kemilüminesans Olayı.....	48
1.6.Biyolüminesans.....	49
1.5. AMAÇ.....	51
2.MATERYAL ve YÖNTEM.....	53
2.1.Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih	53
2.2.Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	53
2.3.Kullanılan Cihazlar	54
2.4.HSP70 in Tris Tamponu Kullanılarak Homojenize Edilmesi.....	54
2.4.1.Homojenizasyon(TRİS) Tamponunun Hazırlanması.....	54
2.4.2.Homojenizasyon İşlemi İçin Balıkların Hazırlanması.....	54
2.4.3.HSP70 in DEAE Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılması.....	55
2.4.4.Poliakrilamid Jelin Hazırlanması.....	55
2.4.5 Örneklerin Hazırlanması.....	56
2.4.6.Elektroforez	57
2.5.Lüsiferaz Katlanma ve Termal Agregasyon Deneyleri.....	58
2.6 ATP Hidroliz Deneyleri.....	58
2.7 <i>Cyprinion macrotomus</i> ve <i>Garra rufa obtusa</i> 'dan Saflaştırılan Hsp70 Proteininin Florimetre Spektroskopisi ile Denaturasyon Deneyleri	59
3. BULGULAR.....	60
3.1.Hsp70 Saflaştırılması.....	60
3.2.Lüsiferaz Katlanma ve Termal Agregasyon Deneyleri	60
3.3. ATP Hidroliz Deneyleri.....	62
3.4. <i>Cyprinion macrotomus</i> ve <i>Garra rufa obtusa</i> 'dan Saflaştırılan Hsp70 Proteininin Florimetre Spektroskopisi ile Denaturasyon Deneyleri	62
4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	67
KAYNAKLAR.....	69

EKLER

EK-1 Valilik İzni.....	73
EK-2 Hayvan Etik Kurul İzni.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.1 Sivas Balıklı Kaplıca'daki balıklar.....	2
Şekil 1.1.2 Sedef hastalığını tedavi eden doktor balıklar.....	3
Şekil 1.2.1 <i>Gara rufa</i> örnekleri.....	6
Şekil 1.2.2 <i>Cyprinion</i> örneği.....	7
Şekil 1.3.1 Isı sok proteinleri etkileyen faktörler.....	9
Şekil 1.3.2 Proteinlerin üç boyutlu yapıda katlanmaları.....	9
Şekil 1.3.3 Eşzamanlı polipeptit katlanmalar.....	10
Şekil 1.3.4 Moleküler şaperonlar yardımı ile protein katlanmaları.....	10
Şekil 1.3.5 Önemli Hsp Aileleri.....	11
Şekil 1.3.6 Hsp70 /Hsp40 etkileşimi ve ATP ye bağlı olarak substrat değişimi.....	12
Şekil 1.3.7 HSP70 'in ATPaz domain bölgesi.....	14
Şekil 1.3.8 HSP70 'in Substrat bağlayıcı ve C – terminal bölgeleri.....	15
Şekil 1.3.9 HSP70'in protein katlama mekanizması.....	15
Şekil 1.3.10 DnaK 'nın şaperon döngüsünün modeli.....	16
Şekil 1.3.11 Prokaryot hücrelerde Hsp70 şaperon ailesinin şematik döngüsü.....	17
Şekil 1.3.12 Ökaryot hücrelerde Hsp70 şaperon ailesinin şematik döngüsü.....	18
Şekil 1.3.13 Stres cevabında ısı şok proteinler (HSP) ve şaperon ağı.....	20
Şekil 1.4.1 İyon değişim kromatografisinin şematik görünümü.....	29
Şekil 1.4.2 İyon değiştiriciler.....	30
Şekil 1.4.3 Jel geçirgenlik kromatografisi.....	35
Şekil 1.5.1 Spektrofluorometrenin temel öğelerini gösteren şema.....	41
Şekil 1.5.2 Floresans spektrometresinin örnek kompartmanı.....	42
Şekil 1.5.3.SSa1'in üre ile denaturasyon eğrisi.....	47
Şekil 1.6.1 Ateş Böcekleri.....	49
Şekil 2.4.1 Hazırlanan Örneklerin Kuyucuklara Yüklenmesi.....	57
Şekil 3.1.2 Hsp70 saflaştırması SDS-PAGE jeli.....	60
Şekil 3.2.1 İki Balık Türündeki Hsp 70 proteinin zamana göre % aktivite grafiği....	61
Şekil 3.3.1 <i>Cyprinion</i> ve <i>Garra Rufa</i> Hsp70 'inin ATP hidrolizi sonucu zamana göre kalan ATP miktarı grafiği.....	62
Şekil 3.4.1 <i>Cyprinion markostomus</i> için Hsp70 denaturasyon eğrisi.....	63
Şekil 3.4.2 <i>Cyprinion markostomus</i> için Hsp70 denaturasyon eğrisi (ADP varlığında).....	64
Şekil 3.4.3 <i>Garra rufa obtusa</i> için Hsp70 denaturasyon eğrisi.....	65
Şekil 3.4.4 <i>Garra rufa obtusa</i> için Hsp70 denaturasyon eğrisi (ADP varlığında).....	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 4.5.1 Protein saflaştırma tekniklerinin özellikleri.....	27
Çizelge 1.4.6.1 Yaygın kullanılan iyon değiştiriciler.....	31
Çizelge.3.2.1 Garra Rufa ve Cyprinion Türlerinden saflaştırılan Hsp 70'in Aktivitesinin Zamanla değişimi.....	61

1. GİRİŞ

Modern stres araştırmaları Ritossa'nın yaptığı araştırmalar ile başlamıştır. Ritossa, rutin hücre gen ekspresyon mekanizmasının stres durumlarında tekrar programlanma ile hücre stres cevabı oluşturduğunu ilk tespit eden kişidir (Ritossa, 1962). *Drosophila melanogaster*'da ısıya bağlı spesifik değişiklikleri tanımlamıştır. Bu gözlemden 10 yıl sonra araştırmalar protein düzeyine çıkmıştır. Hücrede normalde geniş bir protein dağılımı görölmektedir. Stres durumlarında rutin sentezlenen protein miktarlarında azalma ile birlikte strese bağlı protein sentezinde artma görölmüştür. Stres durumlarında sentezi artan bu grup proteinler heat shock protein (Hsp) olarak tanımlanmıştır ve moleküler ağırlıklarına göre gruplandırılmışlardır. Hsp-70 insan vücudunda iyi tanımlanmış tip olup 70 kDa'luk bir proteindir (Cristoph, 2005).

Balık organizmalarda stresi çalışmak için iyi bir modeldir. *Cyprinion macrostomus* (vurucu) ve *Garra rufa obtusa* (yalayıcı) Sivas Balıklı Kaplıcada yaşayan iki Cyprinidae türüdür. Bu türler 40 °C ye varan sıcaklıklarda yaşarlar fakat normal yaşama sıcaklıkları en fazla 25 °C'a kadardır. Kaplıcada ortalama sıcaklık yıl boyunca 35 °C dir. Bu ortamda birçok zorluk, yüksek basınç, düşük oksijen miktarı, aşırı sıcaklık, besin kıtlığı, ağır metaller ve enfeksiyon sürekli fizyolojik stres oluşturur. Tüm bu etkiler doku ve hücre homeostazı kaybına yol açar. Üstelik bu etkiler serbest radikal üretimini tetikler. Kaplıca suyu çözünmüş selenyum içerir ve selenoenzimlerle birleşen önemli bir mineraldir (Özer ve ark, 1987).

1.1 Sivas Kangal Balıklı Kaplıca'daki Balıklar

Sivas ili Kangal ilçesinde bulunan kaplıca (ermik) , ölkemiz boyutlarında deri ve romatizmal hastalıkların tedavisinde büyük bir ün yapmıştır. Bu kaplıcanın ünü ve önemi özellikle içinde yaşayan balıklardan ileri gelmektedir. Kaplıca suyunun yıl boyunca 35±0,5°C de olması ve kimyasal içeriği nedeniyle çeşitli hastalıklara iyi geldiği ve çamaşırları beyazlattığı yöre halkı arasında çok yaygın bir kanıdır. Diğer yandan kaplıca suyunda yaşayan balıkların buraya giren insanların deri ve yaraları üzerinde beslenmeleri nedeniyle deri hastalıklarına çok iyi geldiği kanısı ise oldukça önem kazanmıştır (Brown, 1957).

Yeryüzünde geniş bir dağılım gösteren kaplıcalar sıcak, temiz, birçok mineral içeren ve genellikle oksijen yönünden fakir su kaynaklarıdır. Besin zinciri açısından da fakir olan bu sulara bazı balık türlerinin yaşadığı bilinmektedir. 39 °C nin üzerindeki

sıcak sularda balıkların yaşadığına dair bilgiler vardır. Bu tür sıcak sularda yaşayan balıkların çoğu *Cyprinidon* cinsine ait balıklardır. Bazı Cyprinidae familyası üyeleri de sıcak sularda yaşayabilmektedir (Brown, 1957, Al – Habib ve Al – Habib, 1979).



Şekil 1.1.1 Sivas Balıklı Kaplıca'daki balıklar

([http://www.akvaryum.com/forum/doktor,kangal_baligi_\(gar_k313539.asp](http://www.akvaryum.com/forum/doktor,kangal_baligi_(gar_k313539.asp)Ege Üni, İzmir, 272s).

Doktor Balıklar; Ülkemizde iyi tanınan ve bu şekilde isimlendirilen balıklar, Cyprinidae familyasına ait olan *Cyprinion macrostomus* ve *Garra rufa obtusa* olup fito ve zooplankonla beslenirler. Yeterli beslenemediklerinde gelişimleri gecikir ve saldırganlaşırlar. Dolayısıyla buldukları havuzlara giren insanların vücuduna yönelirler. Balıklar, suyun etkisi ile yumuşayan ve kolaylıkla koparılabilen hastalıklı deri plakalarını tercih ederler. Böylelikle kabuklar uzaklaşır, az miktarda kanama olur ve yara, yüksek düzeyde selenyum içerdiği için iyileşmesinde etkili olan su ile gün ışığına maruz kalır. Bu işlem, sedef hastalığının ve abseli bölgelerde irinin akarak %100 iyileşmesini sağlar (<http://www.cumhuriyet.edu.tr/sivas/sivas05.html>.,Undar, Akarpınar, ve Yanıkoğlu, 1990).



Şekil 1.1.2 Sedef hastalığını tedavi eden doktor balıklar(<http://www.sivasinternet.net/>)

Garra cinsinin dâhil olduğu Cyprinidae familyası tür sayısı bakımından en zengin ve en önemli balık familyalarından biridir ve dünyanın farklı bölgelerine yayılmıştır. Türkiye’de bulunan kemikli balıkların büyük bir kısmı bu familyaya aittir ve yaygın olarak tatlı su kaynaklarında bulunmaktadır. Dünyada bu familya yaklaşık 1500 türle temsil edilir ve bunların 30 cins ve 70 türü Türkiye’de bulunmaktadır. Cyprinidae familyasına ait *Garra* cinsi özellikle ülkemizin güney bölgelerinde yaygındır ve 2 türle temsil edilmektedir (Kuru. 1971, Kuru. 1979). Bunlardan özellikle “doktor balık” olarak adlandırılan *Garra rufa obtusa* Sivas çermiklerinde yüksek sıcaklıkta yaşamakta birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. *G. Rufa* özellikle sedef hastalığı ve çeşitli deri hastalıklarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Ergene, Gözükara ve Çavas, 2001).

Sıcaklık ve iyonik bileşim açısından mevsimsel bir değişim göstermeyen kaplıca suyunun özellikleri;

Renk	: Çok hafif sarı berrak
Tortu	: Yok
pH	: 7.20-7.25
Toplam sertlik	: 32.23
Sıcaklık	: $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
Çözünmüş oksijen	: 4.41 ± 0.30
Serbest H_2S	: Yok
İletkenlik	: 590 (μmho)
Serbest CO_2	: 8.88 mg \ L
Radyoaktivite	:
Toplam alfa aktivitesi	: 3.77 ± 0.81 pCi\ L
Toplam beta aktivitesi	: 5.03 ± 1.57 pCi\ L
Radon (Rn-222)	: 180 pCi\ L
Radyum (Ra-226)	: 0.59 pCi\ L
Uranyum (U-238)	: 0.842 mg\ L

1.2 Cyprinidae

Kaburga ve kas yapısı; Cyprinidae türündeki balıklarda kaslar arası kemiklerde denilen dorsal kaburgalardan başka kaslar arası kemiklerde vardır. Bunlar miyoseptumlar boyunca uzanan ve türlere göre Y ve C harfi biçiminde ya da düz olabilen ince kemiklerdir, omurların çeşitli bölgelerine bağlanır ve bağlandıkları yere göre adlandırılırlar (Demir, 2009).

Sindirim sistemi; Cyprinidae türlerinde mide yoktur. Ancak diğer balıklarda genellikle mide vardır.

Balıklar üreme stratejilerine göre sınıflandırıldığında; Cyprinidae familyası yumurta gizleyiciler (yumurtalar gömülür ya da başka biçimde gizlenir) grubunun ostrakofiller (yumurta canlı omurgasız hayvanların kabukları içine gizlenir) alt grubuna girer (Demir, 2009).

Kimi yırtıcı balıkların beyni, toplam vücut ağırlığının % 1'inden daha az olabilir. Oysa Cyprinidae'nın birçoğunda onun iki katı kadardır (Demir, 2009).

Tat alma duyusu; Palatal organı olan Cyprinidae familyasıyla yapılan deneyler, bu balıkların şeker ve diğer tatlı maddelerin, asitlerin, amino asitlerin, birçok tuzun, kinin ve benzeri acı maddelerin tadını, tükürük, süt, toprak solucanı özütü, balık derileri ve benzer maddelerin özütlerini de alabildiklerini göstermiştir. Vücudun çeşitli kısımlarındaki tat alma reseptörlerinin tat alma yeteneğinin ve çeşitli değerlerinin farklı olduklarını ve türler arasında da dikkate değer farklar bulunduğu, yine deneysel olarak saptanmıştır. Bununla birlikte genel olarak balıkların tat alma duyusu insanınkinden daha fazla gelişmiştir. Örneğin Cyprinidae'de sakkaroz için eşik değer, insanınkinden 500 – 900 kez daha küçüktür. Fruktosa karşı duyarlılık insanınkinden 2500 kez, sodyum klorüre karşıysa yaklaşık 200 kez fazladır (Demir, 2009).

Koku alma duyusu; Balıkların kokulara karşı duyarlılıkları türlere göre çok değişir. Kokulara karşı tepkileri ise yalnızca türlere göre değil daha önceki bireysel öğrenimlerine göre de değişir. Birçok tür balık, besinlerini koku alma yardımıyla arar ve bulur. Bunlar arasında başlıca Cyprinidae türü bulunmaktadır (Demir, 2009).

Cyprinidae familyası dünyadaki en büyük ikinci familya olup, tatlı sularda en çok yayılış gösteren birinci familyadır. Güney Amerika ve Avustralya dışında tüm kıtalarda bulunmaktadır. Bu dağılış şekliyle ilksel tatlı su balıkları olup, denizler arasında göç etmediklerine işaret edilmektedir (Durand ve ark., 2002). Bu familyayla ilgili filogenetik bağlantıları belirlemek, biyocoğrafik veriler elde etmek amacıyla çok sayıda

moleküler filogenetik çalışma yapılmıştır. (Brito ve ark., 1997; Briolay ve ark., 1998; Gilles ve ark., 1998; Zardoya ve ark., 1999; Durand ve ark., 2000; Tsigenopoulos ve Berberi, 2000; Machordom ve Daodrio, 2001).

G. rufa ve *C. macrostomus* türleri Cyprinidae ailesinin üyeleridir. Cyprinidler Asya ve Afrika'nın çeşitli yerlerinde çok geniş bir dağılım gösterdikleri halde, ılıman bölgeler dışında gittikçe azalmışlardır ve özellikle soğuk iklim bölgelerinde tamamen yok olmuşlardır(Geldiay ve Balık, 1988). Cyprinidae ailesi üyelerinden olan *Cyprinion* cinsinin tahminen Indus' tan batıya doğru dağıldığı düşünülmektedir (Howes, 1982). Ailenin üst sınırı sayılan Mytus ve Mastecembelus'lar da dahil olmak üzere Cypinion'lar İran'ın büyük bir kısmında yoktur. Esas yayılış sahası Hindistan, özellikle İran-Irak olmak üzere ön Asya, Fırat ve Dicle nehir sistemlerini kapsayan bu tür, doğudan ülkemize de girmiştir, ancak Tarsus (Mersin) civarına kadar uzanabilmiştir. Adana, Antakya ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yaşadığı bilinen bu türe ilişkin bugüne kadar Asi, Dicle ve Fırat nehir sistemleriyle Berdan Suyu'ndan (Tarsus) kayıtlar verilmiştir (Geldiay ve Balık, 1988).

1.2.1 *Garra rufa obtusa* (HECKEL, 1843)

Türkçe adı: Yağlı balık, kaya balığı

Yerel adı: Kaya balığı

İlk bulunuş yeri: Halep



Şekil 1.2.1 *Garra rufa obtusa* örnekleri

(<http://banditosbanditosbanditos.typepad.com/weblog/2007/06/index.html>)

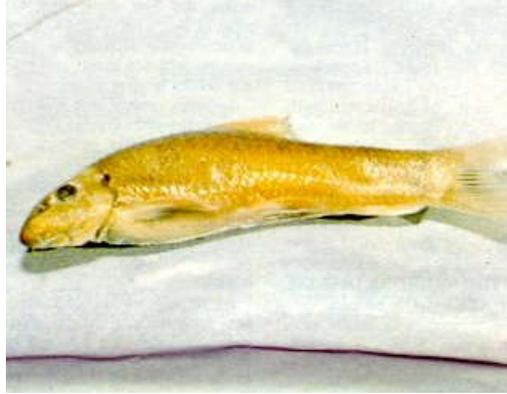
Garra rufa obtusa bireylerinin vücutları nispeten ince uzun, silindirik yapıda ve iri pullarla örtülüdür. Burun ucu küttür ve üzerinde kabarcıklar bulunur. Ağız ventral konumlu ve hilal seklindedir. Ağız etrafında iki çift kısa bıyık bulunur. Dorsal yüzgeç

ventral yüzgeçlerin önünden başlar ve serbest kenarı düzdür. Standart boy vücut yüksekliğinin yaklaşık olarak 4,5 -5 katı kadardır. Burun uzunluğu standart boyun 1/12'si kadardır. Dorsal yüzgeç uzunluğu standart boyda 6.11 defa bulunur. Standart boy predorsalin 2 kat, kuyruk sapı uzunluğunun ise yaklaşık 4 katı kadardır. Burun uzunluğu baş boyunda 2.82 göz çapı ise baş boyunda ise 5-6 defa bulunur. Bıyık uzunluğu standart boyun yaklaşık olarak 1/34.5'i kadardır. Kuyruk sapı uzunluğu / Kuyruk sapı yüksekliği oranı 2,3 ve baş boyu/ bıyık uzunluğu oranı ise yaklaşık olarak 8 olarak bulunmuştur. Renkleri bütün vücutta aynı olup genellikle açık kahverengidir. Ancak özellikle sonbahar ve kış aylarında renkler bütün vücutta aynı olmadığı ve vücuda düzensiz bir şekilde dağılmış siyah lekelerin bulunduğu belirlenmiştir. Alt dudağına bitişik ve gayet iyi gelişmiş tutunma organı (vantuz) sayesinde çok hızlı akan akarsularda bile kolaylıkla yaşama olanağı bulurlar. Boyları en fazla 19 cm kadardır (Undar ve ark., 1990).

1.2.2 *Cyprinion Macrostomus* (HECKEL, 1843)

İlk bulunuş yeri: Halep, Musul

Türkçe: Beni balığı



Şekil 1.2.2 *Cyprinion macrostomus* örneği

(<http://www.psoriasisfishcure.com/researches/doctorfish.htm>)

Yanlardan yassılaştırmış olan vücut yüksektir ve her tarafı iri pullarla örtülüdür. Maksimum vücut yüksekliği standart boyda 2,8-3,7 defa vardır. Baş boyu vücut yüksekliğinden daha kısadır. Müso küt, ağız ise ventral pozisyonadadır. Alt dudak üst dudağına nazaran çok kalın ve pürtüksüzdür. Ağız etrafında gayet kısa bir çift bıyık bulunur. Dorsal yüzgecin en uzun basit ışını gayet kuvvetli kemikleşmiş olup arka

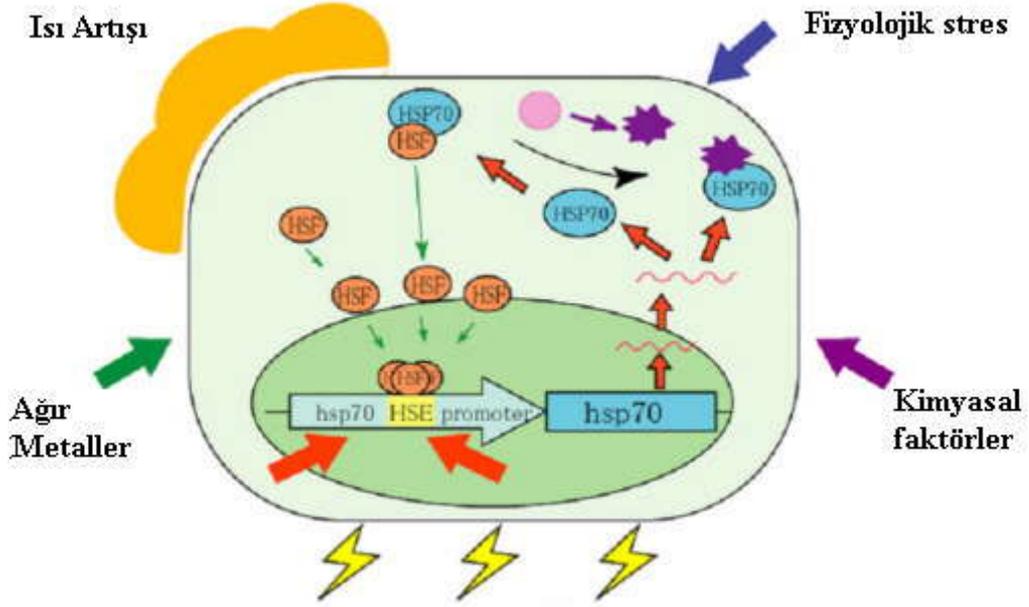
kenarı testere dişi gibi tırtıklıdır. Kuyruk yüzgeci derin girintili ve loplarının ucu sivridir. Boyu 15-17 cm civarındadır (Geldiay ve Balık, 1988).

Vücut rengi genellikle her tarafta homojen olup, peritoneum siyah renklidir. Vücudun yan taraflarında düzensiz şekilli ve sayıları 6-8 arasında değişen siyah renkli benekler vardır. Ayrıca solungaç kapakları üzerinde de gri-esmer küçük lekeler bulunur. Bu balıklar, akarsuların zemini kumlu ve çakıllı olan zonlarına yakın yerlerinde yaşarlar. Biyolojileri hakkında yeterli bilgi yoktur (Geldiay ve Balık, 1988).

Esas yayılış sahası Hindistan, ön Asya, Dicle ve Fırat nehir sistemlerini kapsayan bu tür, Doğudan ölkemize de girmiştir, ancak Tarsus (Mersin) civarına kadar uzanabilmiştir. Bu güne kadar Asi, Dicle ve Fırat nehir sistemleriyle Berdan suyundan (Tarsus) kayıtlar verilmiştir (Geldiay ve Balık, 1988).

1.3 Hsp 70

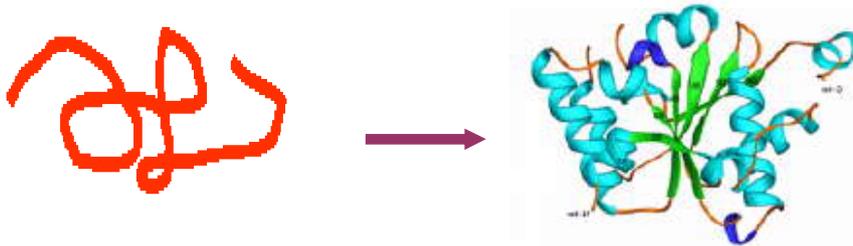
1962'de Ritossa tarafından keşfedilen Isı Şok Proteinleri (Hsp); ilk olarak yüksek ısıya maruz bırakılan *Drosophila* (sirke sineği) tükrük bezi hücrelerindeki kromozomal kümelerde tariflenmiştir (Rylander ve ark., 2005). Takip eden onlu yıllarda; birçok araştırmacı Hsp'lerin filogenetik olarak prokaryotlar, mayalar ve bitkilerden ökaryotlara kadar bütün organizmalarda bulunan çok korunmuş familyalardan biri olduğunu göstermişlerdir (Milani ve ark., 2002). Hsp'lerin keşfinden sonra; iskemi, hipoksi, basınç artması, ağır metaller, serbest oksijen radikalleri, protein kinaz C, kalsiyum ajanının artması, etanol, amino asid ve glukoz analogları, inflamasyon, sodyum arsenit, hormonlar, antibiyotikler, sitokinler ve enfeksiyonu içeren stresin yoğun olduğu durumlarda Hsp yükselmesinin tetiklenebileceği izlenmiştir (Rylander ve ark., 2002). Hsp ekspresyonunun artması gelişim ve farklılaşma gibi normal fizyolojik durumların sonucuyla da uyarılabilir (Rylander ve ark., 1999). Özellikle Hsp 70 ve 27 'nin yüksek ısı, iskemi, oksidatif stres ve antikanser ilaçlarla uyarıldığı izlenmektedir (Rylander ve ark., 2005).



Şekil 1.3.1 Isı şok proteinleri etkileyen faktörler

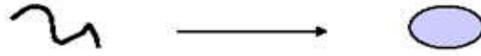
1.3.1. Protein Katlanmaları (Folding)

Proteinlerin fonksiyonlarını yapabilmeleri için öncelikle yapısal olarak uygun şekilde katlanmaları gerekir. Bu sayede yapısal görevlerini gerçekleştirebilmeleri için gereksinim duydukları üç boyutlu yapıyı kazanırlar.



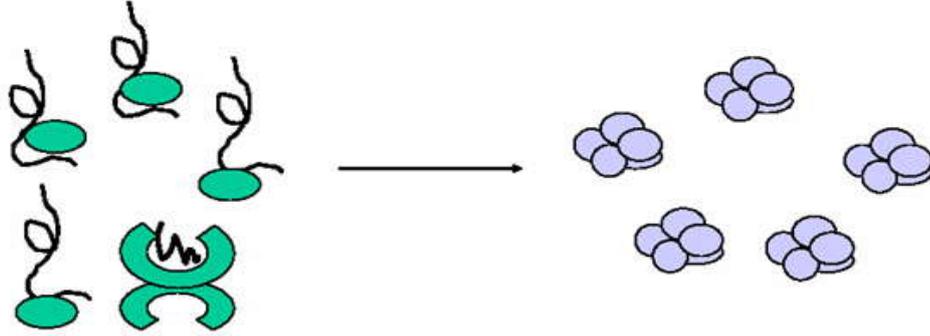
Şekil 1.3.2 Proteinlerin üç boyutlu yapıda katlanmaları (Tutar, 2006)

Küçük tek domain proteinler için eş zamanlı polipeptit katlanmalar düşük derişimlerde, düşük sıcaklıkta meydana gelir.



Şekil 1.3.3 Eşzamanlı polipeptit katlanmalar (Tutar, 2006)

Protein derişiminin yüksek olduğu sitozolde, ısı şok proteinleri protein katlanması için gereklidirler. Özellikle, yüksek sıcaklıklarda ve büyük multi-domain protein katlanmaları için gereklidir.



Şekil 1.3.4 Moleküler şaperonlar yardımı ile protein katlanmaları (Tutar, 2006)

Mutasyonlar veya çevresel stres, proteinlerde hasara neden olur. Eğer yanlış katlanmış veya zarar görmüş proteinler belli bir kritik noktanın üstünde birikirse, nörodejeneratif (sinir hücrelerinin tahrip olmasıyla oluşan) hastalıklara neden olur. Huntington, Parkinson, Alzheimer ve Lou Gehrig bu tip hastalıklara örnek verilebilir.

1995 yılında insandaki ısı şok genini ilk defa klonlayan Profesör Morimoto “ısı şok tepkisinin dünyadaki bütün canlılarda ortak özellik” olduğunu ifade etmiştir.

1.3.2 Hsp (Heat Shock Protein) Ailesi

Hsp'ler moleküler ağırlıklarına göre familyalarla karakterizedir. Tipik olarak Hsp 78, 75, 60 ve 10 organellerde bulunur. HspSP 110, 90, 73,72 ve 20 nükleus ve sitozolde mevcuttur. Her bir Hsp'nin birçok belgelenmiş fonksiyonu vardır ve hücre içinde çeşitli lokalizasyonlarda bulunurlar (Rylander ve ark., 2005). Selüler seviyede Hsp'ler endoplasmik retikulum, mitokondri, sitozol ve nükleusta günlük streslere cevap olarak düşük seviyelerde vardır (Rylanderve ark., 2005; Terzioğlu ve ark., 1999).

Önemli Hsp Aileleri

Şaperon	Molekül topoloji	Fonksiyon	Yapı
Hsp100 (ClpB)		Bozulma için ATP 'ye bağımlı toplanmalar ve açılmalar	N-terminal domain Çözümlenen NBD1
Hsp90	proteinler için çoklu bağlayıcı yer	steroid hormon alıcılarının uygun matürasyonu	Çözümlenen ATPaz domain
Hsp70(DnaK)		Genişletilen polipeptitlerin hidrofobik bölgelerinin ATP 'ye bağlı stabilizasyonu	Ayrı olarak çözümlenen ATPaz domain ve peptit bağlayıcı domain
Hsp60, Hsp10 (GroEL, GroES)		Doğal durumda ATP 'ye bağlı protein katlanması	Çözümlendi
Küçük Hspler	farklı oligomerler	Stabilizasyona karşı ısı şoku sırasında kümeleşme	Bazıları çözümlendi

Şekil 1.3.5 Önemli Hsp Aileleri

1.3.2.1 Hsp 100

Fizyolojik koşullar altında bu protein moleküler şaperonlar gibi fonksiyon göstererek, proteinlerin yeniden düzenlenmesinde görev alır. Hsp 100 protein kümelerini ayırmak için onları eritir. Özellikle Hsp 100 ailesi içinde yer alan Hsp 104 yeni toplanan proteinleri kurtarma yeteneğine sahiptir. Ayrıca Hsp 100 mayalarda sıcaklık toleransının kazanılmasında da görev alır (<http://www.cs.stedwars.edu/chem/Chemistry/Chem43/Chem43/HSP/Structure>; Pockley, 2001). Bitkilerde Hsp 100 belli bir ısı toleransından sonra kapasitesini yitirir.

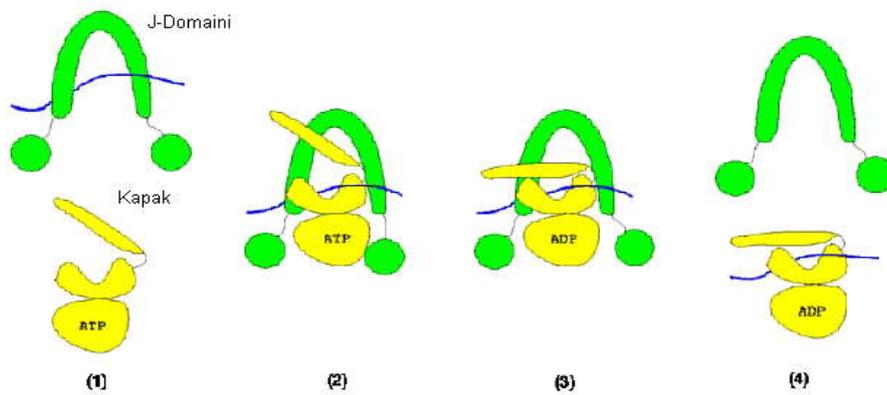
1.3.2.2 Hsp 90

Hsp 90 proteinlere bağlanarak onların aktivasyonunu ve katlanmasını düzenler. Geri katlanan peptidlerin kümeleşmesini önler. Sitoplazma ve endoplazmik retikulumda bulunur. Endoplazmik retikulumda en fazla bulunan ısı şok proteini'dir (<http://www.cs.stedwars.edu/chem/Chemistry/Chem43/Chem43/HSP/Structure>). Hsp 90, HSF1 (Isı şok faktör-1)'in fizyolojik koşullarda durumunun dengelenmesinde görev alır.

1.3.2.3 Hsp 70

Hsp 70 sitoplazma, çekirdek, endoplazmik retikulum ve mitokondride protein taşınmasına katılır (www.elsevier.com/locate/immpharm). Stres altında proteinleri korur. Katlanmamış proteinlerin kümeleşmesini önler. Katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi sağlar. Polipeptitleri birbirine bağlar. Hsp 70 HSF' nin aktivitesini düzenler ve ısı şok proteinlerin transkripsiyonunun kontrolünü sağlar. ATP'ye bağlanır ve ATPaz aktivitesi gösterir (<http://www.cs.stedwars.edu/chem/Chemistry/Chem43/Chem43/HSP/Structure>; Pockley, 2001) E.coli ve insan Hsp 70 amino-asit zinciri %50 benzerdir.

Hsp70 proteinlerinin ısı şoku koruması, bazı proteinlerin organellere iletilmesi, sitozolde proteinlerin katlanmasına yardım gibi biyokimyasal fonksiyonları vardır. Bu işlemleri Hsp40 (ko-şaperon) ile etkileşimle gerçekleştirirler. Hsp70 in kristal yapısı bulunamamasına karşın domainleri ayrı ayrı kristallendirilmiş ve domainlerin oryantasyonunun Şekil 1.3.6 daki gibi olduğu tahmin edilmektedir (Jones GW ve Masison DC. 2003). ATP hidrolizi proteinin substrat bağlama kapağının açılıp kapanmasını sağlar. Ayrıca Hsp40 proteini J-domaini vasıtasıyla substratı Hsp70 e sunar ve Hsp70 substratın katlanmasına yardımcı olur (Şekil 1.3.6 1-4). ADP oluşumu döngüyü tekrar başlatır.



Şekil 1.3.6 Hsp70 /Hsp40 etkileşimi ve ATP ye bağlı olarak substrat değişimi (Tutar ve ark., 2006)

Hsp70 proteinleri aynı zamanda polipeptitlerin kararlı konformasyona erişmesine de yardımcı olurlar. Hücre için hayati öneme sahip olan bu makro moleküller peptitlere bağlandıkları zaman ATP hidrolizlerini artırır ve peptitin üçüncül yapısını bulmasına yardım ederler. Aynı zamanda ATP hidrolizi de peptide bağlanmayı artırır. Hangi prosesin önce olduğu deneylerle kanıtlanmamıştır. Bu bağlanma peptitin yapısına bağlı olarak 10 µM ile 1mM arasında gerçekleşir. Kısa peptitlerle yapılan çalışmalarda Hsp70'lerin minimum yedi amino asit uzunluğa bağlandığı ve dördüncü pozisyonda yer alan lösin amino asitlerini tercih ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca hücrenin farklı kompartımanlarında yer alan orijini aynı fakat muhtemelen farklı fonksiyonları olan Hsp70'ler (Hsp ve Hsc gibi) ve Hsp40'lar (Sis1 ve Ydj1 gibi) vardır. Farklı fonksiyonları olan Hsp70 ve Hsp40'ların aynı anda hücrenin aynı kompartımanında yer almasının nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Biyokimyasal ve genetik araştırmalar prionların kinetik ve mekanik oluşumunu ortaya çıkarmıştır fakat hücrede oluşan metabolik bozulmaları önleyen Hsp70'lerin yapı ve fonksiyon ilişkileri açıklığa kavuşturamamıştır. En detaylı çalışmalar *E.coli* de yapılmış olmasına rağmen ökaryotlarda mekanizmanın daha kompleks olduğunu gösterir ve bu bilgi önümüzdeki yıllarda kompleks protein-protein etkileşimlerinin, kooperativitenin ve Hsp70'lerdeki yapısal bağlantılarının ortaya çıkarılma gereğini koymuştur (Newnam ve ark., 1999)

1.3.2.4 Hsp 60

HSP 60 14 alt üiteden meydana gelir. Mitokondri ve sitoplazmada bulunur. HSP 70 ile birlikte proteinin doğal katlanmasına aracılık yapar. Stresten korunma ve protein katlanması için gereklidir. Hatalı katlanan polipeptidlere bağlanarak doğru katlanmalarına yardım eder (Nollen ve ark., 1999).

1.3.2.5 Küçük Isı Şok Proteinler (sHsp)

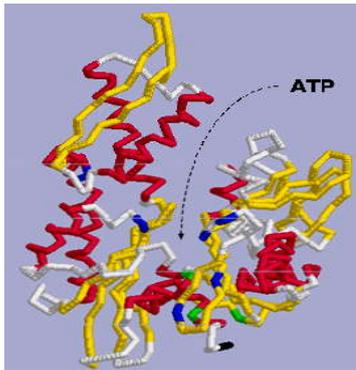
Futbol topu görünümündedirler. sHsp monomer molekülü 15-40 kDa'luk kütleler halinde bulunur. Tüm sHsp'ler yaklaşık 100 kalıntı ve C ucunda hakim olan bir kristallin veya ısı şok hakimiyeti ile belirtilir. Sitoplazma ve çekirdekte bulunur. Isı stresi görülen hücrelerde belirgin olarak artış gösterir. Ayrıca antioksidan özelliği vardır ([http://www.cs.stedwars.edu/chem/Chemistry/Chem43/Chem43/HSP/Structure](http://www.cs.stedwars.edu/chem/Chemistry/Chem43/Chem43/HSP/Structure;); (Pockley, 2001). Memeli hücrelerinde, sHsp'ler sadece strese karşı korunmada değil,

aynı zamanda diğer hücrese fonksiyonların modülasyonunda görev aldığı bilinmektedir (Wang ve ark., 2004).

1.3.3 Hsp70 'in Yapısı

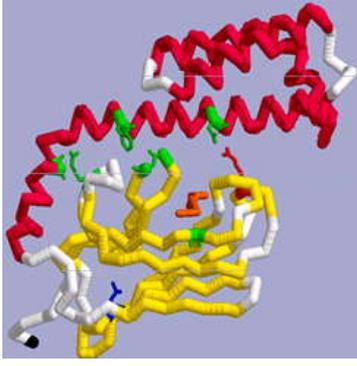
Hsp70, proteinlerin üç boyutlu yapıya erişmesini ve proteinlerin bu yapılarını korumasını sağlayan, türler arasında evrensel olarak bulunan önemli bir proteindir. Bu protein translasyon, membranlar arasında protein taşıma ve klatrin parçalanması gibi hücrese görevlerine ilaveten üçüncül yapılarına kısmi olarak erişmiş proteinlere bağlanıp agregasyonu önleyerek hücreleri stresten korur. Tüm bu farklı fonksiyonlar substratın proteine bağlanma ve salınmasına bağlı olarak düzenlenmiştir. Stresten koruma mekanizması deli dana, Creutzfeldt-Jacob, Gerstmann-Straussler-Schienker, insomnia, kuru gibi çeşitli ölümcül nörodejeneratif hastalıkların engellenmesi için önemlidir.

Hsp70'ler üç farklı domainden oluşur; 44 kDa'lık ATPaz domain, 18 kDa'lık substrat bağlanma domain ve 10 kDa'lık C-terminali. Substrat bağlanması ATP hidrolizi ve nükleotid değişimi ile düzenlenerek nükleotit bağlayıcı bölgeye tutturulur ve katlanması sağlanır.



→ 44 kDa'lık ATPaz domaini

Şekil 1.3.7 HSP70 'in ATPaz domain bölgesi (Tutar, 2006)

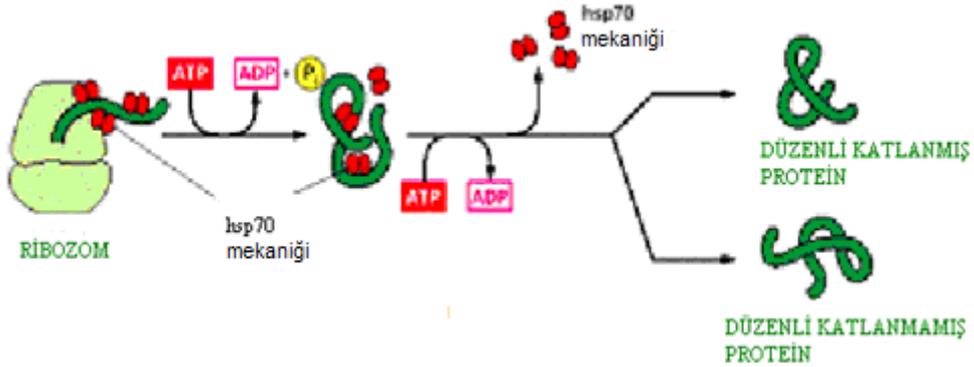


→ Şekilde ortadaki oyuk şeklindeki bölge 18 kDa’luk substrat bağlayıcı bölgesi ve yukarıda kalan bölge ise 10 kDa’luk C – terminal bölgesidir.

Şekil 1.3.8 Hsp70 ‘in Substrat bağlayıcı ve C – terminal bölgeleri (Tutar, 2006)

1.3.4. Şaperon Mekanizması

Spesifik şaperon mekanizması her bir Hsp için farklıdır. Hsp 70, protein yüzeyindeki küçük esnek hidrofobik amino asidin tanınması ile uygunsuz katlanmış proteinleri keşfeder. Küçük bir Hsp 40 protein kümesinin yardımıyla Hsp 70 monomerleri hedef proteine bağlanır ve ATP ADP molekülüne hidrolize olur, bu yapısal değişiklik Hsp 70’in hedefe sıkıca kenetlenmesine neden olur. Hsp 40’ın ayrılmasından sonra, Hsp 70 proteininin ayrılması ATP’den ADP salınımının olması ile uyarılır. Hsp proteinlerinin bağlanması ve ATP’den ADP salınım sikluslarının tekrarlanması hedef proteinlerin tekrar katlanmasına yardım eder. Hsp 70’in apoptotik yolda sitokrom-c salınımı ve başlatıcı kaspaz aktivasyonunun her ikisini etkileyebildiği ve bu etkiler için şaperon fonksiyonunun gerekli olduğu kanıtlanmıştır (Rylander ve ark., 2005).



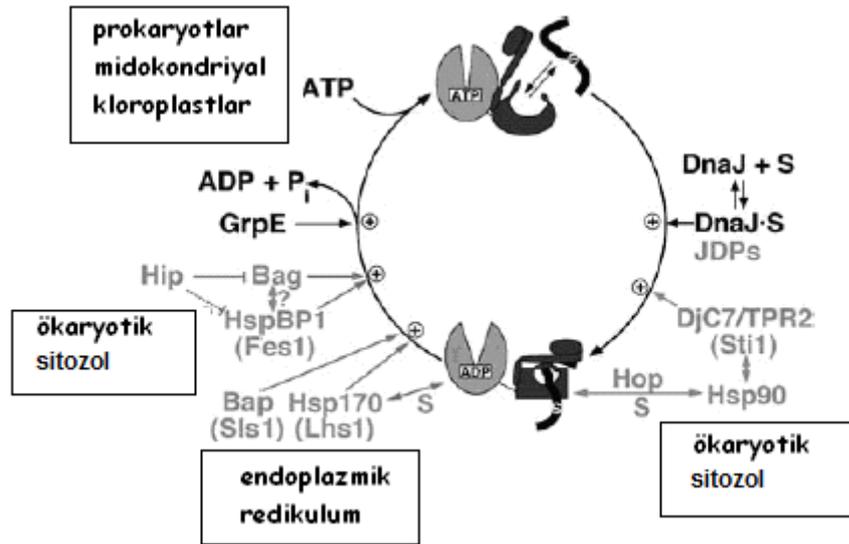
Şekil 1.3.9 Hsp70’in protein katlama mekanizması (Rylander ve ark., 2005)

1.3.5 Hsp70'in İzofomları

Son dönemde yapılan çalışmalar Hsp70 şaperon sisteminin bağlanma ve ayrılma döngüsü mekanizmasının prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde belirgin bir biçimde farklı olduğunu göstermektedir.

E.Coli mekanizması katlanmamış peptit ve onu DnaK molekülüne hedeflemekte DnaJ etkileşimi ile başlar. Sonra DnaJ DnaK ATPaz bölgesinin hidrolitik etkisini artırır ve geriye kalan peptitli DnaK ATPaz kompleksi kararsızdır. Daha kararlı ve daha uzun gelişmeye başlayan polipeptit zinciri olan parçalar açığa çıkararak çabuk bir biçimde ayrışır (Mayer ve ark., 2000).

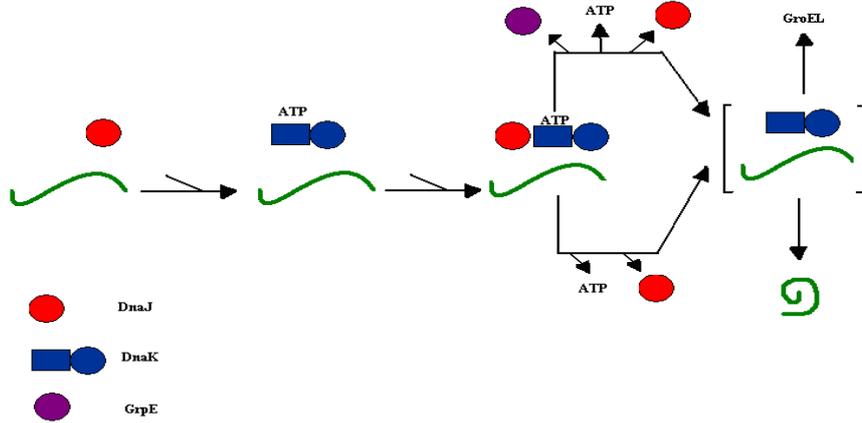
Ökaryotik hücrelerde çeşitli Hsp70 izoformları vardır, bazıları sürekli/konstitif (Hsc70) bazıları hücre strese maruz kaldığında/indüktif (Hsp70) eksprese edilirler. Hsp70 fonksiyonu üzerine yoğun çalışmalara rağmen konstitif ve indüklenen izoformların olması ve bunların farklı fonksiyona sahip olup olmadığı açıklanamamıştır. İndüktif Hsp70 ortamdaki Hsp70 derişimi ve sitozoldaki stres önleyici fonksiyonunu artırmak için üretilmiş olabilir. Alternatif olarak benzer koşullarda indüktif Hsp70 in özel bir görevi de olabilir (Mantsch ve ark. 1993).



Şekil 1.3.10 DnaK'nın şaperon döngüsünün modeli. Siyah renkle gösterilen *E.coli* deki DnaK sistemi için temel döngüdür. Gri renkle gösterilen ökaryotik sitozol ve endoplazmik retikulumdaki değişikliklerdir (Mayer ve Bukau, 2005).

Protein katlanmasındaki yardım ayrıca katlanmamış peptitlerin şaperoninleri gibi diğer moleküler şaperon sistemlerine transferi ile uzatılabilir. Rhodanas katlanma

üzerinde araştırmalar bu son işlemin muhtemelen GrpE tarafından yardım edildiğini ileri sürer. DnaJ katlanmamış proteini DnaK'nın da yardımıyla ATP hidrolizini kullanarak katlar. Şekil 1.3.11 tarif edilen bu dđngüyü resmeder.



Şekil 1.3.11 Prokaryot hücrelerde Hsp70 şaperon ailesinin şematik dđngüsü (Chappell, T. G ve ark.,1986)

Ökaryotik hücre dđngülerindeki temel fark tepkimenin ilk aşamalarındaki Hip varlığına bağlıdır. Katlanmamış peptit Hsp70 ile direkt olarak tepkimeye girer fakat Hsp40 varlığı bağlanma sürecini belirgin bir biçimde kolaylaştırır. Bir sonraki aşamada Hsp40 peptit/Hsp70 kompleksine bağlanır, ATPaz aktivitesini tetikler ve Hsp70 kompleksi daha kararlı olan ADP-bağlı durumu benimser (Mayer ve ark., 2000).

Hip molekülünün bağlanması ayrıca bu durumu da dengeler. Dđngü ADP'nin yavaş bir biçimde ayrılmasıyla, bir sonraki ATP molekülü edinimi ve ATP-bağlı molekülünün 'açık' formunun ayrılmasıyla sona erer. Bu dđngünün aşamaları Şekil 1.3.12 de belirtilmiştir.

yaratan değişik ajanların saldırılarına karşıda cevap olarak üretimlerinin artması ‘‘stres proteinleri’’ olarak adlandırılmalarına neden olmuştur (Baykal ve ark., 2000).

Hsp’ler protein katlanması ve translokasyonuna yardım eden moleküler şaperonlardır (Milani ve ark., 2002). Moleküler şaperon terimi; stres proteinlerinin, selüler proteinlere onların transportuna yardım etmek için bağlanma yeteneği olarak tanımlanır (Ostberg ve ark., 2002). Selüler stres altında proteinler denatüre olur ve agregatlar oluşturabilir, bu olay nihayetinde hücre ölümüyle sonuçlanacaktır. Hsp’ler hücre stresi esnasında selüler proteinlere bağlanarak agregatlaşmaktan onları korur ve degrade ve kötü katlanmış polipeptidlere bağlanması ile tahrip olmuş hücrelerin iyileşmesine yardım eder. Hsp’ler proteinlerin hatalı katlanmasını ve agregasyonunu önler ve denatüre proteinlerin yeniden katlanmasını (refolding) ve degradasyonunu kolaylaştırır (Rylander ve ark., 2005, Milani ve ark., 2002, Ellis ve Van Der Vies, 1991). Hsp 70 arada katlanmamış durumda olan proteinlerin prematürken bağlanmasını engeller. (Ellis ve Van Der Vies, 1991).

1.3.7 Isı Şok Proteinlerinin Görevleri

Isı şok proteinleri hem hücre içerisinde ve hücre dışında fonksiyon gösterirler.

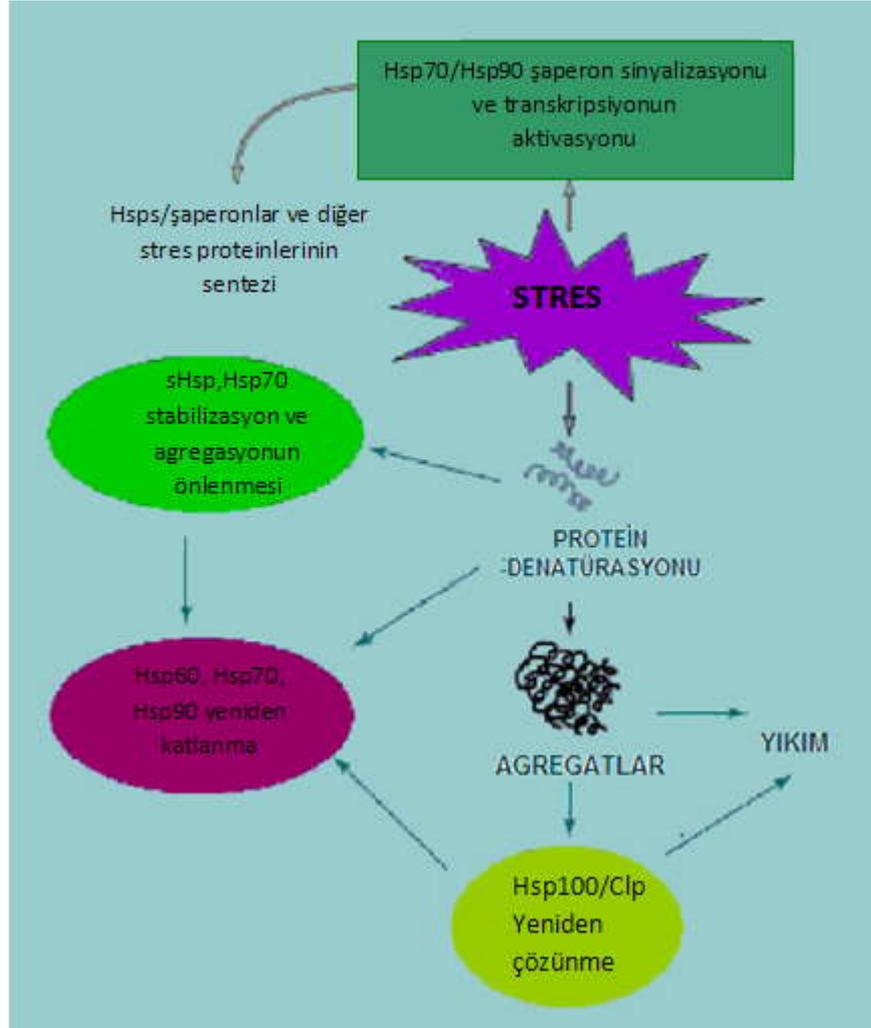
1.3.7.1 Isı Şok Proteinlerin Hücre Dışı Görevleri

Hsp’ler hücre içerisinde normal olarak bulunurlar. Hücre dışında ise hücrelerin öldüğü ve içeriği dışarı atıldığında bulunurlar. Bu dağınık hücrelerin planlanmamış ölümü nekroz olarak adlandırılır ve hücrede sadece hatalı eylemler meydana getirir. Hücre dışındaki Hsp’lerin hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü indükleyici etkileri vardır (Pockley, 2001).

1.3.7.2. Isı Şok Proteinlerin Hücre İçi Görevleri

Hsp’lerin normal görevleri hücre içerisinde (proteinlerin katlanmasına yardım ederek ve proteinlerin hazırlanmasını düzenleyerek) her proteinin bağlayıcı olmasını sağlamaktadır. Hsp’ler hücre içerisindeki peptidleri kuşatarak sınırlandırılmalarını sağlar. Hücre içerisine peptitler Hsp’ler ile alınır. Bu proteinler hücre sel şaperonlar gibi fonksiyon görürler, protein sentezinde ve taşınmasında rol oynarlar. Çünkü bu proteinler benzersiz hücre sel yerleşime sahiptir. Stres boyunca çok sayıdaki enzim ve yapısal proteinde zararlı yapısal ve fonksiyonel değişim meydana gelmektedir. Bu sebeple stres

altında bulunan hücrelerin hayatta kalmasında, proteinlerin kendi fonksiyonel konformasyonlarını sürdürmek, doğal olmayan proteinlerin toplanmasını önlemek, denatüre proteinlerin yeniden yapılanması ile tekrar fonksiyonel yapılarına dönmeleri ve fonksiyonel olmayan ama zararlı olabilecek peptidlerin ortadan kaldırılması önemlidir. Böylece, Hsp/şaperonlar hücreSEL korumada tamamlayıcı rol oynamak ve bazen bir arada çalışmak suretiyle proteinleri stresten korumaktadır. (Wang ve ark., 2004).



Şekil 1.3.13 Stres cevabında ısı şok proteinler (Hsp) ve şaperon ağı (Wang ve ark., 2004)

1.3.8. Isı Şok Protein Gen Transkripsiyonu

Isı şok proteinin gen transkripsiyonu, ısı şok faktör transkripsiyon faktörleri ile ısı şok protein gen promotor bölgelerindeki ısı şok elementlerinin etkileşimi aracılığı ile sağlanır. Normal koşullar altında ısı şok faktör 1 (HSF1) sitoplazma içinde DNA'ya bağlı olmayan bir monomer molekül gibi bulunur. Stres koşulları altında HSF1,

DNA'ya bağlanma kapasitesine sahip olmak için üç fosfatlı forma dönüştürülür ve sitoplazmadan çekirdeğe geçer. Çekirdekte HSF DNA'nın promotör bölgelerine bağlanır. Böylece Hsp geninin transkripsiyonunu sağlayarak, Hsp sentezini artırır (Pockley, 2001).

Isı Şok Proteinlerinin Artışına Sebep Olan Faktörler

Çevresel Faktörler	Hastalık Durumu	Normal Hücre Etkileşimi
-Isı şoku (Yüksek ve düşük sıcaklık)	-Ateş	-Normal hücre döngüsü
-Ağır metal geçişleri	-Yangı	-Büyüme faktörleri
-Enerji metabolizması	-İskemi	-Gelişme ve Farklılaşma
İnhibitörleri		
-Kemoterapötik ajanlar	-Hipertrofi	
- Hücrel hasar	- Malignensi	

Isı Şok Proteinlerinin Teşhis Yöntemleri

- 1) Elektroforez
- 2) PCR (özellikle küçük ısı şok proteinlerinin teşhisinde tercih edilmektedir)
- 3) ELİSA
- 4) Western Blotting

1.3.9 Isı Şok Proteinleri ve Hastalıklardaki Rolü

Stres yanıtlarının önemi açıklanmasına rağmen, son zamanlarda yapılan araştırmalar sadece ısı şok proteinlerinin hücrenin hayatta kalması ve patojenik hastalıkların kontrolü üzerindeki rolüne odaklanmıştır (Clark ve Muchowski, 2000).

1.3.9.1 Isı şok proteinleri ve Bağışıklık

Hücre dışındaki Hsp' ler hastalık veya enfeksiyona karşı bağışıklık sistemini uyarmak için çok güçlü tehlike sinyali gönderirler (Pockley, 2001). Pek çok patolojik ajanın konakta immün cevap oluşturmasında rol oynayan antijenlerdir.

Stres proteinlerine karşı gelişen immün cevaplar çapraz reaksiyonlar vasıtasıyla hücrenin kendisine karşı da (anti-self) reaksiyon gelişimine neden olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin, enfeksiyon veya herhangi bir şekilde strese maruz kalmış kendi hücrelerinden arınmak için, kendi stres proteinlerine karşı immün cevap verebilme

yeteneklerinden yararlanabildikleri ileri sürülmektedir. İşte bu yeteneklerin düzenlenmesindeki bozukluklar bazı otoimmün hastalıklara yol açabilir. Stres proteinleri, immün cevapta hedef olmanın yanı sıra, antijen sunulmasında da önemli rol oynarlar (Laad ve ark., 1999).

1.3.9.2 Isı şok proteinleri ve Kanser

1981 yılında Pramod Srivastara adında bir öğrenci yaptığı bir seri deneyde tümörlü hücreleri parçaladı. Sonra her bir tümörlü hücre parçasını aşılıyarak gelişen kanserden farenin korunduğunu gördü. Daha sonra yapılan deneyler fareyi korumaktan sorumlu elementlerin ısı şok proteinleri olduğunu gösterdi (Laad ve ark., 1999).

Çoğu kanser çeşidinde ısı şok proteinlerin üretimi artar. Kanser hastası bireylerin kanser hücrelerinde Hsp peptit kompleksleri oluşur. Bu anormal peptitlerin hasta hücreler içerisinde bulunuşu, kanserden kansere ve bireyden bireye farklı şekildedir. Bu yüzden anormal peptitlerin çok düşük düzeydeki oluşumu dahi kanser düşüncesini akla getirmelidir (Laad ve ark., 1999). Ayrıca ısı şok proteinler bazı kanser tiplerinde hücre farklılaşma derecesinin de göstergesidir. Bazı kanser tedavilerinde artan Hsp üretimi tedavinin etkili olduğunun belirteçidir. Örneğin göğüs kanserinde Hsp27 ve Hsp70 kemoterapiye karşı olan direncin göstergesidir (Ciocca ve Calderwood, 2005) .

1.3.9.3 Isı şok proteinleri ve Kalp Hastalıkları

Kardiyak yetersizliğe karşı Hsp 70 salınımı artışı, koruma sağlar. Deneysel bir iskemi olgusunda transgenik bir farede Hsp 70 artışının büyük oranda zararı giderdiği gösterilmiştir (Landry, 1998).

1.4 Protein Saflaştırma Amacı ve Stratejisi

İlk kez Berzelius tarafından kullanılan ve 1840 yılında ders kitaplarına geçen “protein” adı yunanca bir numara, birinci sırada olmak anlamına gelen “proteuo” kelimesinden türetilmiştir. Proteinler bu adı haklı olarak taşımaktadır. Sayısız hayat fonksiyonu proteinlere bağlıdır ve proteinsiz bir canlı söz konusu olamaz. Her hücrenin bileşeni olan proteinlerin enzimatik kataliz, transport, depolama, mekanik destek, koordine hareket, sinir impluslarının transmisyonu, immün koruma, büyüme ve farklılaşmanın kontrolü gibi fonksiyonları vardır. Proteinlerin saflaştırılması hem bu fonksiyonları yapan molekülün belirlenmesi ve olayın mekanizmasının aydınlatılması hem de invitro

koşullarda endüstriyel veya analitik amaçla kullanılma olanağının araştırılması açısından büyük önem taşır (Telefoncu, 1996).

1.4.1 Protein Saflaştırmanın Amacı

Protein saflaştırmanın amacı saf protein elde etmek değil daha sonraki çalışmalar için kullanılacak bir protein preparatı hazırlamaktır. Bu çalışmalar; proteinin aktivitesinin araştırılması ve bu aktiviteden biyoteknolojik üretim, analitik veya tedavi edici amaçla yararlanılmasına yönelik olabileceği gibi, protein yapısının veya yapı fonksiyon ilişkisinin araştırılmasını da hedefleyebilir. Amaca uygun bir protein preparatı hazırlayabilmek için aşağıdaki hususların netleştirilmesi zorunludur.

- a) Gereksinim duyulan saf protein miktarı
- b) Ne düzeyde aktivite kaybının tolere edilebileceği
- c) Ne düzeyde saflık istendiği
- d) Saflaştırma işlemi için ne kadar zaman ve para harcanabileceği, v.b.

Biyoteknoloji devrimini yaşadığımız günümüzde kullanım amacına göre gerekli protein miktarı birkaç mikrogram (klonlama çalışmaları) ile birkaç kilogram (endüstriyel ve farmasötik uygulamalar için) arasında değişir. Protein üretiminde zaman ve maliyet çok önemlidir. Gerekli protein miktarı ve saflık düzeyi kullanım amacına bağlıdır. Bilimsel araştırmalar için az miktarda protein yeterlidir fakat preparat kesinlikle zararlı yabancı aktivite içermemelidir. Endüstriyel uygulamalar için büyük ölçekte üretim söz konusudur ve saflık ikinci derecede önem taşır. Tedavi edici uygulamalar için hazırlanan protein preparatının ise yüksek saflıkta olması gerekir.

Protein aktivitesinin belirlenmesi hedeflenmiş ise kesinlikle aktif formda (örneğin; bir enzim, bir regülatör protein veya bir antikor gibi) elde edilmelidir. Bunun için çok az miktarda protein yeterlidir. Fakat amaç proteinin aktivitesinden yararlanmak ise daha fazla protein gerekecektir. İnert proteinlerin bulunması her iki amaç içinde engel oluşturmadığından, yabancı aktiviteler tamamen uzaklaştırılmış ise daha ileri düzeyde bir saflaştırma gereksizdir. Saflaştırmada uygulanacak her yeni adım zaman ve aktivite kaybına sebep olacağı gibi verimi düşürüp maliyeti arttıracaktır.

Yapı araştırma çalışmalarında ise oldukça fazla miktarda ve yüksek saflıkta proteine gereksinim vardır. Bu durumda maliyet ve zaman ikinci derecede önemlidir. Fakat yapı-fonksiyon ilişkisi araştırılıyorsa saflaştırma işlemi süresince aktivite kaybını minimize etmek için işlem süresinin olabildiğince kısaltılması gerekir. Belirli bir miktar çıkış maddesinden elde edilecek saf protein miktarı saflaştırma adımlarının toplam

verimine bağılıdır. Adım sayısı verim ile ters fakat saflık derecesi ile doğru orantılıdır. En az saflaştırma adımı ile amaca uygun saflıkta protein preparatı hazırlamak çok önemlidir. Özellikle afinite kromatografisi ve afinite-ultrafiltrasyon teknikleri protein saflaştırılmasında adım sayısını dramatik biçimde düşürmektedir.

Saflaştırma işlemleri süresince protein denatürasyonundan korunması ve biyolojik aktivitesini yitirmemesine özen gösterilmelidir. Bu şekilde hazırlanan protein preparatı her türlü çalışmada kullanılabilirken amaç yalnız polipeptid zincir dizisini (primer yapı) aydınlatmak ise daha sert koşullarda çalışılmasında sakınca yoktur. Protein saflaştırılmasındaki adımlar denatürasyon ve proteolizi minimuma düşürecek şekilde seçilmelidir (Telefoncu, 1996).

1.4.2 Ön Hazırlıklar

1.4.2.1 Kaynak Seçimi

Seçilen kaynaktan hedeflenen protein hem kararlı hem de bol bulunmalıdır. Ayrıca kaynağın kolay sağlanabilir, bol ve ucuz olması önemlidir. Hayvansal kaynaklar seçilirken saflaştırılacak protein miktarına uygun büyüklükte hayvan seçilmeli ve yabani hayvanlar yerine evcil hayvanlar tercih edilmelidir. Bir zorunluluk yoksa hayvansal kaynaklar yerine kültür ortamında üretilen bakteri, maya, mantar veya memeli hücreleri kullanılmalıdır. Böylece hücre çoğalması sırasında biyosentezleri yönlendirebilme olanağına kavuşulur ve ihtiyaca uygun boyutta reaktör ile üretim yapılabilir. Gen teknolojisinin sağladığı olanaklar sayesinde hücre metabolizması yoğun olarak hedeflenen proteinin biyosentezine yönlendirilebilmektedir. Seçilen konukçu (host) hücrenin proteini ekstraselüler bölgeye salgılaması saflaştırma açısından önemli üstünlükler sağlar.

Kuşkusuz hayvansal ve mikrobiyal kaynaklar yanında bitkisel kaynaklardan da saf protein üretiminde yararlanılabilir. Ancak mevsime, iklime bağımlılık ve transport gibi sorunlar bitkisel kaynakların kullanımını sınırlandırmaktadır.

1.4.2.2 Protein Hakkındaki Bilgi Birikimi

Proteinin moleküler yapısı, fiziksel ve kimyasal özellikleri ekstraselüler veya intraselüler olması ve hücre içinde bulunduğu yerin bilinmesi saflaştırma prosesin belirlenmesinde çok yardımcı olur. Belirli bir proteinin hücre içindeki lokalizasyonu

kaynağa bağımlı değildir, kimyasal yapısı ve molekül boyutu da genellikle benzerlik gösterir.

1.4.3 Protein Saflaştırma Stratejisi

Bir proteinin saflaştırılmasında uygun bir işlem dizisinin optimizasyonu çok önemlidir. En etkili, en hızlı ve en ekonomik ayırma ve saflaştırma proseslerinin mevcut bilgiler yardımıyla belirlenmesi hedeflenir. Bu nedenle saflaştırılacak proteinin bulunduğu kaynaklar, özellikleri ve stabilitesinin iyice tetkik edilmesi gerekir. Uygulanacak ayırma ve saflaştırma teknikleri proteinin biyolojik aktivitesini olumsuz etkilememelidir.

1.4.4 Aktivitenin Korunması

Özellikle intraselüler proteinler saflaştırma koşullarından çok etkilenirler. Hücre içerisinde indirgen koşullar egemen olup pH 6,5-7,5 arasındadır ve protein konsantrasyonunda yüksektir (~100 mg/ml). Hücre ve organellerin parçalanması sonucu ayrı kompartmanlarda bulunan ve birbirini etkileyebilen çeşitli maddeler bir araya gelecekler, proteoliz etkinleşecek ve ortam pH'sı düşecektir. Ayrıca proteinlerin kolayca yükseltgenmeleri söz konusudur. Tüm bu problemlerin aşılabilmesi için tampon ve tampona katılacak maddelerin seçimi özel bir önem taşır. Düşük sıcaklıkta (~ 4 °C) ve hızlı çalışma sonucu *proteolizin* etkinliği azalır. Proteolitik enzimler daha çok lizozomlarda lokalize olduklarından homojenizasyon koşullarında lizozom membranlarını dayanıklı kılmak için tampon çözeltiye maltoz ve sakkaroz gibi disakkaridler ilave edilebilir. Ayrıca tampona proteolitik enzim inhibitörlerinin katılması da çok etkili bir önlemdir. Çoğu proteolitik enzimlerin molekül kütleleri 20-30 kDa arasında olduğundan hedeflenen proteinin mol kütlesi daha büyük ise protein saflaştırma prosesinin ilk adımlarında jel geçirgenlik kromatografisi uygulanabilir. Fakat bu tekniğin kapasite ve ayırma gücünün çok düşük olması gibi sakıncaları vardır.

Asidik veya bazik pH koşulları, organik çözümler ve sıcaklık *protein denatürasyonuna* neden olan ana parametrelerdir. Hücre içi pH koşullarına (pH 6,5- 7,5) uygun tampon sistemler kullanılması, saflaştırmanın ilk adımlarında 4 °C'de (proteolizi önlemek için), daha sonraki adımlarda ise oda sıcaklığında (20-25 °C) çalışılması çoğu proteinler için denatürasyona neden olmaz. Organik çözümler ile protein çöktürme adımı gerekli ise bu işlemin düşük sıcaklıkta yapılması uygundur. Enzim aktif merkezleri reaktif gruplar içerdiğinden substrat dışında birçok yabancı madde ile etkileşebilir ve enzim inaktif hale gelir. Hücre parçalanmasından sonra intraselüler

enzimlerin karşılaştığı yükseltgen ortam özellikle HS-proteazların hızlı inaktivasyonuna sebep olur. Bunu önlemek için tampona 2-merkaptoetanol veya ditiyotreitol ilave edilir. 2-merkaptoetanol ancak 24 saat koruyucu etkiye sahiptir ve kokusu rahatsız edicidir. Ditiyotreitol hem daha düşük konsantrasyonda hem de uzun süre etkilidir. Yükseltgenler yanında Me^{2+} iyonları da HS-gruplarını bağlayarak inaktivasyona neden olurlar. Eğer protein veya enzim kendisi metal iyonu içermiyor ise EDTA gibi kompleksleştiricilerin de tampona katılmasında yarar vardır. Ayrıca tampona saflaştırılacak enzimin substrat veya kofaktörünün katılmasında inaktivasyona karşı etkili bir önlemdir.

Protein saflaştırma adımlarında proteinin cam reaksiyon kaplarının yüzeyinde adsorpsiyonu büyük bir sorundur. Bu sorunu aşabilmek için polipropilen kaplar kullanılır. Özellikle seyreltik protein çözeltileri yüzey adsorpsiyonu ile önemli kayıplar verdikleri gibi kuartern yapıları proteinlerin alt birimlerinin (subunit) ayrışmasında söz konusudur. Ortama sığır serum albumini (< % 0,1) veya iyonik olmayan deterjanların (< % 0,1) katılması adsorpsiyon kayıplarını en aza indirirse de her iki katkı maddesi protein saflaştırmada bazı sorunlara neden olabilir. Tampona şeker alkoller (gliserin, sorbitol, mannitol v.b) ve bazı şekerlerin (glukoz, sakkaroz) katılması su aktivitesini düşüreceğinden denatürasyon ile fonksiyonel protein kaybını azaltır. Ayrıca % 20'den fazla gliserin katılırsa $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de donmadan protein çözeltisinin saklanması mümkündür. Protein saflaştırma işlemine uzun süreli ara verme (bir gece gibi) durumunda çözeltiliye bakteriyostatik ve proteaz inhibitörleri ilave edilmeli ve soğuk odada saklanmalıdır. Daha uzun süreli bekletmelerde çözelti dondurulmalıdır. Sıvı azot veya kuru buz-metanol karışımı ile şok dondurma tercih edilir. Yüksek konsantrasyonlarda amonyum sülfat proteinleri stabilize ettiğinden bir gece veya daha uzun depolama amonyum sülfat ile çöktürme adımından sonra yapılmalıdır.

1.4.5 Stratejik Planlama

Saflaştırmanın stratejik hedefi ucuz ve etkili yöntemler ile yüksek saflık ve verim ile protein kazanmaktır. Saflaştırmada kullanılacak tekniklerin seçimi ve sıralaması çok önemlidir. Çizelge 1.4.5.1'de protein saflaştırmada kullanılan temel tekniklerin bir kıyaslaması verilmiştir.

Çizelge 1. 4.5.1 Protein saflaştırma tekniklerinin özellikleri (Telefoncu, 1996)

Teknik	Dayandığı Özellik	Kapasite	Etkinlik	Verim	Maliyet
pH çöktürmesi	Yük	Yüksek	Çok düşük	Orta	Düşük
(NH ₄) ₂ SO ₄ çöktürmesi	Hidrofobisite	Yüksek	Çok Düşük	Yüksek	Düşük
Ekstraksiyon	Değişik	Yüksek	Çok Düşük	Yüksek	Düşük
Biyoafinite kromatografisi	Biyoafinite	Yüksek	Yüksek	Değişebilir	Yüksek
İyon değişim Kromatografisi	Yük	Orta	Orta	Orta	Orta
Hidrofobik etkileşim Kromatografisi	Hidrofobisite	Orta	Orta	Orta	Orta
Kromatofokuslama (odaklama)	Yük/ pI	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Boya afinite kromatografisi	Değişik	Orta	Yüksek	Orta	Orta
Ligand afinite kromatografisi	Biyoaktivite	Orta düşük	Çok yüksek	Düşük	Yüksek
Jel Geçirgenlik kromatografisi	Molekül boyutu	Çok düşük	Düşük	Yüksek	Orta

Saflaştırmanın ilk adımlarında daha çok deriştirmeye yönelik (yüksek kapasiteli) teknikler kullanılır. Böylece ortamdaki suyun büyük kısmı uzaklaştırılmış olur. Çöktürme, ekstraksiyon ve absorpsiyon kromatografi teknikleri bu amaçla kullanılabilir.

Ayrıca gücü açısından çöktürme ve ekstraksiyon teknikleri etkin değilken kromatografik teknikler özellikle afinite kromatografisi çok etkindir ve 1000 kattan fazla saflaştırma sağlar. Afinite-ultrafiltrasyon kombinasyonu gibi yüksek ayırma güçlü tekniklerin kullanılması saflaştırma prosesindeki adım sayısını çok düşürür. Fakat afinite tekniklerinin çok pahalı olduğu, bu nedenle çöktürme gibi ucuz teknikler ile kontaminantların önemli oranda uzaklaştırılmasından sonra uygulanmaları gerektiği

unutulmamalıdır. Protein saflaştırmada uygulanacak teknikler genel olarak aşağıdaki sırayı izler:

- a) Homojenizasyon
- b) Çöktürme
- c) İyon değişim kromatografisi
- e) Jel Geçirgenlik kromatografisi

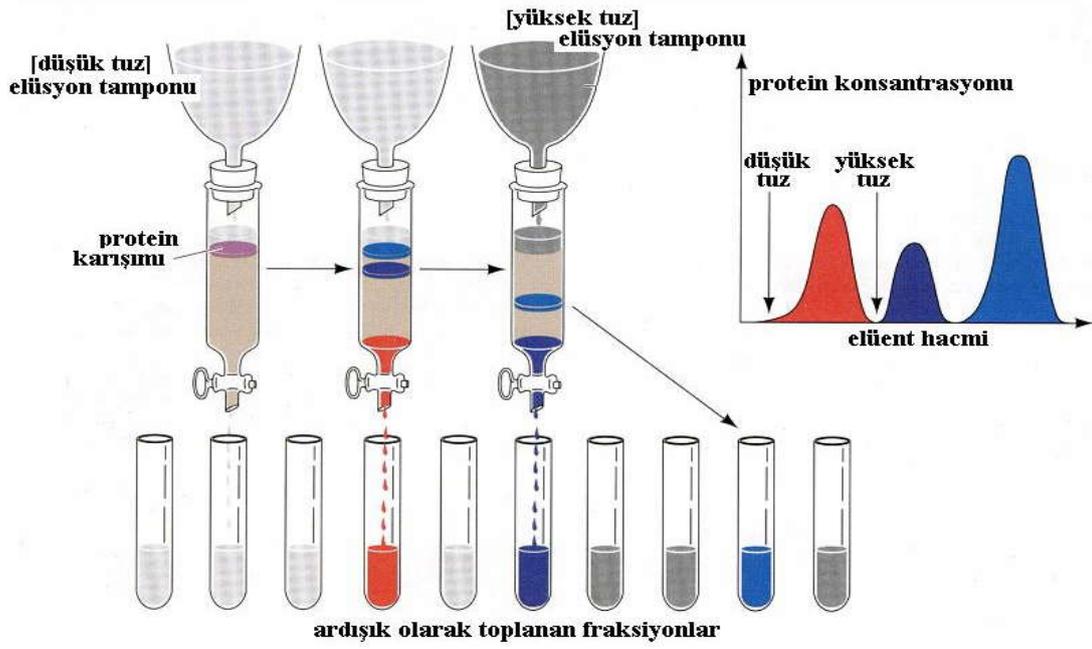
Saflaştırmanın verimi protein tayini ile kaç kat saflaştırma gerçekleştirildiği ise birim protein kütlesi başına fonksiyonel aktivitenin ölçülmesi ile bulunur. Protein saflık testi ve kaç yabancı protein içerdiği jel elektroforezi ile belirlenir. Safsızlıkların molekül kütleleri SDS-PAGE ile tayin edilir ve safsızlıklar jel geçirgenlik kromatografisi ile uzaklaştırılır.

1.4.6 Kromatografi

Kromatografi kelimesi Yunanca “chroma” renk ve “Graphein” yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında görünür renkli bitki pigmentlerin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir. Kromatografi farklı bileşiklerin değişken bir şekilde farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Daima durağan faz (stasyonel faz) ve hareketli faz (mobil faz) vardır. Hareketli faz durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden bileşenler birbirinden ayrılır. Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, durağan faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin tabiatına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir (Telefoncu, 1996).

1.4.6.1 İyon-Değişim Kromatografisi

Elektrostatik çekime dayanan bu adsorpsiyon kromatografisinde örnekte bulunan bileşenler yüklü durağan faza olan afinitelerine göre ayrılırlar.

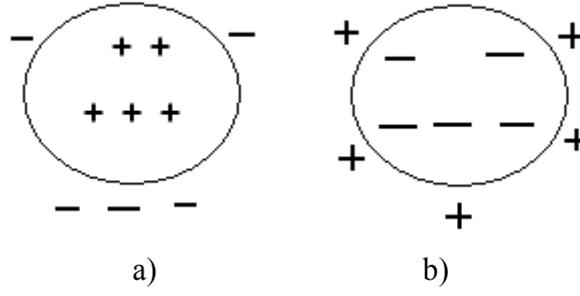


Şekil 1.4.1 İyon değişim kromatografisinin şematik görünümü

İyon değıştiriciler iki kısımdan oluşur:

1. İçinde ve yüzeyinde kimyasal olarak (kovalent bağlarla) bağlanmış yüklü gruplar bulunan üç boyutlu, çapraz bağlarla bağlanmış çözünür olmayan dolgu maddesi (matriks).
2. Hareketli karşı iyonlar. Karşı iyonlar tersinir olarak aynı yükteki başka iyonlarca, çözünür olmayan dolgu maddesinde herhangi bir değışikliğe yol açmadan değıştirilebilirler (Boyer, 1993).

İyon değıştirici dolgu maddesi şayet pozitif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar negatif olup, bu tür iyon değıştiriciler negatif iyonları değıştirdiklerinden *anyon değıştiriciler* adını alırlar. Benzer şekilde şayet dolgu maddesi negatif gruplarla kimyasal olarak bağlanmışsa, karşı iyonlar pozitif olup, bu tür iyon değıştiriciler pozitif iyonları değıştirdiklerinden *katyon değıştiriciler* adını alırlar (Şekil 1.4.2).



Şekil 1.4.2 İyon değiştiriciler a) Anyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar b) Katyon değiştiriciler ve değiştirilebilir karşı iyonlar (Pharmacia Fine Chemicals AB,1980).

Dolgu maddesi alüminyum silikatlar, sentetik reçineler, polisakkaritler v.b. olabilir. Dolgu maddesinin tabiatı iyon değiştiricilerin mekanik kararlılığını, akış özelliğini, bozulabilen biyolojik maddelere karşı davranışını ve kısmen de kapasitesini belirler. İlk kullanılan iyon değiştiricileri sentetik reçineler olup suyun demineralizasyonunu ve su kalitesini düzeltmede ve atıklardan iyonların kazanılmasında kullanılmıştır. Bu tür iyon değiştiriciler yüksek derecede yüklü gruplarla kovalent olarak bağlanmış hidrofobik polimer dolgu maddeleri olup biyolojik maddelerin saflaştırılmasında uygun değildir zira yüksek yük yoğunluğu ve polimerlerin hidrofobik oluşu biyolojik maddelerin denatüre olmalarına sebep olur. Biyolojik maddelerin ayırımında ilk kullanılan iyon değiştiriciler Peterson ve Sober (1956), tarafından geliştirilen selüloz iyon değiştiricilerdir. Hidrofilik tabiatı sebebiyle selülozun proteinleri denatüre etme eğilimi çok düşüktür. Pharmacia Fine Chemicals firması tarafından geliştirilen modifiye dekstran olan “Sephadex”, çapraz bağlı agaroz olan “Sepharse” ve epiklorohidrin ile çapraz bağlanarak kuvvetlendirilmiş selüloz olan “Sephacel” iyon değiştiricileri, küresel tanecikli yüksek gözenekli ilk iyon değiştiricilerdir. Bu günlerde çok farklı destek maddesi vardır ancak protein fraksiyonlanması için en yaygın tercih edilen destek maddesi selülozdur (Johnstone ve Thorpe, 1982). Fiberli selülozik iyon değiştiricilerin peptid ve protein saflaştırılmasında tercih edilme sebebi peptid ve proteinlerin bu dolgu maddesinde çok kararlı olmalarıdır (Boyer, 1993).

Yaygın olarak kullanılan iyon değiştiricilerin, değiştirdikleri iyon yüklerine göre türleri, destek maddeleri, destek maddesine kovalent olarak bağlı iyonik grupları, karşı iyonları, pH kullanım aralıkları ve zayıf veya kuvvetli iyon değiştirici türleri Çizelge 1.4.6.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 1.4.6.1 Yaygın kullanılan iyon değiştiriciler (Telefoncu,1996)

İyonik Grup	pH Kullanım Aralığı	Mevcut Maddeleri
Anyon Değiştiricileri		
Zayıf Anyon Değiştiricisi Dietilaminoetil (DEAE) Fonksiyonel Grup: -O-CH ₂ CH ₂ N ⁺ -(C ₂ H ₅) ₂ H Cl ⁻ Karşı iyon: Cl ⁻	2-9	Dekstran, Agaroz, Bilyeleştirilmiş selüloz, Lifli selüloz, Mikrogranüler selüloz
Kuvvetli Anyon Değiştiricisi Kuaterner aminoetil (QAE) Fonksiyonel Grup: -O-CH ₂ CH ₂ N ⁺ - (C ₂ H ₅) ₂ CH ₂ CH(OH)CH ₃ Cl ⁻ Karşı iyon: Cl ⁻	2-10	Dekstran, Lifli selüloz
Kasyon Değiştiricileri		
Zayıf Kasyon Değiştiricisi Karboksimetil (CM) Fonksiyonel Grup: -O-CH ₂ COO – Na ⁺ Karşı iyon: Na ⁺	3-10	Dekstran, Agaroz, Lifli selüloz, Mikrogranüler selüloz
Kuvvetli Kasyon Değiştiricisi Sülfopropil (SP) Fonksiyonel Grup: -O-CH ₂ CH ₂ CH ₂ SO ₃ – Na ⁺ Karşı iyon: Na ⁺	2-12	Dekstran, Mikrogranüler selüloz

İyon değiştiricilerin karşı iyonları absorplama kabiliyeti kantitatif olarak **kapasite** olarak tanımlanır. İyon değiştiricisinin total kapasitesi, o iyon değiştiricisinin kuru gramında bulunan yüklü ve potansiyel olarak yüklü grupların miktarıdır. Genel olarak miligram kuru ağırlık başına iyonlaşabilen grupların miliekivalenleri olarak ifade edilir ve deneysel olarak titrasyonla tayin edilir. İyon değiştiricisinin kapasitesi destek maddesinin gözeneğinin fonksiyonudur. İmalatçıların literatüründen protein için mevcut kapasite mikrogranüler, bilyelenmiş selüloz ve agaroz için çok benzerdir (0,11-0,15 g albumin / ml DEAE türevi iyon değiştiricisi). İyon değiştiricilerin yüksek kapasitesi çok büyük hacimlerin prosesine ve sonra konsantre şekilde eldesine imkan verir.

İyon değişim kromatografisi ile ayırmada temelde iki etap vardır: İlk etap örnek tatbiki ve iyon değiştirici üzerinde adsorpsiyon, ikinci etap ise adsorbe edilen örnek bileşenlerinin kolondan ayrılmış olarak elüe edilmeleri (süzülmeleri) (Boyer, 1993).

1.4.6.2 Proteinlerin İyon-Değişim Kromatografisi İle Saflaştırılması

Proteinler iyon değiştiricilere zıt yüklü gruplar arasındaki iyonik etkileşimle tersinir olarak bağlanırlar. Baęlanan proteinler ya tampon çözeltilisinin iyonik gücü kademeli olarak arttırılarak ya da tampon çözeltilisinin pH'ı değiştirilmek suretiyle protein yüzeyindeki etkileşen grupların yükü yok edilmek suretiyle kolondan ayrı ayrı elüe edilirlen. Bütün bu işlemler esnasında iyonik değiştiricinin yükü sabit kalacak bir pH aralığı sečilmelidir yoksa bütün proteinler kolondan ayrılmadan birlikte elüe olurlar.

Bağlanma gücü hem proteinin izoelektrik noktasıyla hem de toplam yükü ile bağlantılıdır. Dolayısıyla aynı izoelektrik noktasına sahip iki protein denge izoelektrik fokuslama ile ayrılmazken iyon-değişim kromatografisiyle ayrılabilirler (Johnstone ve Thorpe, 1982).

1.4.6.3 İyon Değiştiricinin Seçimi

Amfoterik maddeler olan proteinlerin net yükleri değişkendir. Düşük pH'larda pozitif, yüksek pH'larda negatif ve izoelektrik noktada (pI) ise sıfır yüklüdür. Proteinlerde etkileşime giren yük grupları başlıca karboksil, amino veya tersiyer amino gruplarıdır. Dolayısıyla anyon değiştiricileri proteinlerin protonuz karboksil gruplarını bağlarken protonlanmış amino gruplarını iter. Genel kaide olarak toplam aspartik asid ve glutamik asid artığı değişken proteinler anyonik değiştiriciler ile ayrılırken, lizin, arjinin ve histidin içeriği farklı proteinler katyonik değiştiricilerle ayrılabilirler. Ancak, bu kaide kesin bir kaide değildir, zira bağlanmayı etkileyen birçok faktör vardır. Bu sebeple

proteinlerin ayrılmasına teşebbüs edilmeden protein karışımının hem asidik hem de bazik şartlarda poliakrilamid jellerle elektroforezinin yapılmasında fayda vardır. Elektroforetik ayrımlar, yaklaşık olarak anyon ve katyon değişim kromatografisinin analitik versiyonları olarak hizmet ederler. Örneğin, eğer karışımın iyi bir ayırımı alkalın elektroforezle elde edilirse o zaman preparatif olarak benzer pH'ta anyon değiştirici ile ayrılabilir. Prensipde amfoterik moleküller hem anyon hem de katyon değiştiricilerine bağlanabilirler ama büyük biyomoleküllerle çalışılırken kararlılık pH aralığında dikkate alınması gerekir. Kararlı pH aralığı, biyomolekülün denatüre olmadığı pH aralığıdır (Pharmacia Fine Chemicals, 1980).

1.4.6.4 Tampon Seçimi

Tampon çözeltisinin pH'ı iyon değiştiricinin çalışma aralığında olmalı ve proteine zarar vermeyecek pH aralığında bir değerde olmalıdır. Proteinin değiştiriciye bağlanması için pH izoelektrik noktasının en az yarı, tercihen bir birim uzağında (anyon değiştiriciler için üstünde, katyon değiştiriciler için altında) olmalıdır. İzoelektrik noktasının çok üzerindeki veya çok altındaki pH'lar gereğinden daha kuvvetli bağlanmayı indüklediğinden sonuçta denatürasyon ve düşük geri kazanıma yol açar.

Proteinlerin bağlandığı pH'taki tampon başlangıç tamponu olarak alınır, zira proteinler bağlanmalı ancak serbest kalacakları pH'a yakın pH'ta olmalıdır ki, çok yüksek güçte iyonik güç kullanılmadan kolondan elüe edilebilsinler. Başlangıç pH'ı aynı zamanda zayıf mı kuvvetli mi iyon değiştirici kullanılmasının gerektiğini gösterir. Zayıf iyon değiştiriciler, anyon değiştiricilerde pH 6'nın altında katyon değiştiricilerde pH 9'un üzerinde yüklerini kaybetmeğe başlarlar. Kuvvetli iyon değiştiriciler sadece çok düşük iyonizasyonlu maddelerin ayırımında kullanılır.

1.4.6.5 Kolon Seçimi

Diğer kolon kromatografilerinde de olduğu gibi kullanılan cam kolonun iç çapı, kolon boyunca aynı olmalı, çıkış noktasında "ölü hacim" mümkün olduğunca az olmalıdır. Çıkış musluğu deliğinin iç çapı 1 mm civarında olmalıdır. En kullanışlı kolonların boyu 90-100 cm olup çapı örneğin miktarınca belirlenir. Örneğin hacmi total kolon hacminin % 5'ini geçmemeli hatta iyi bir ayırım için % 1-2 tercih edilmelidir. Genelde 10-30 mg protein/100 ml reçine iyi bir yüklemedir. Daha fazla protein verimi arttırırken ayırımı düşürür. Dolayısıyla ürünün saflığı azalır. Az yükleme ise, ayırımı arttırırken verimi düşürür. İyon değişim kromatografisinde genelde 20-30 cm kolon boyu uygundur. Hatta

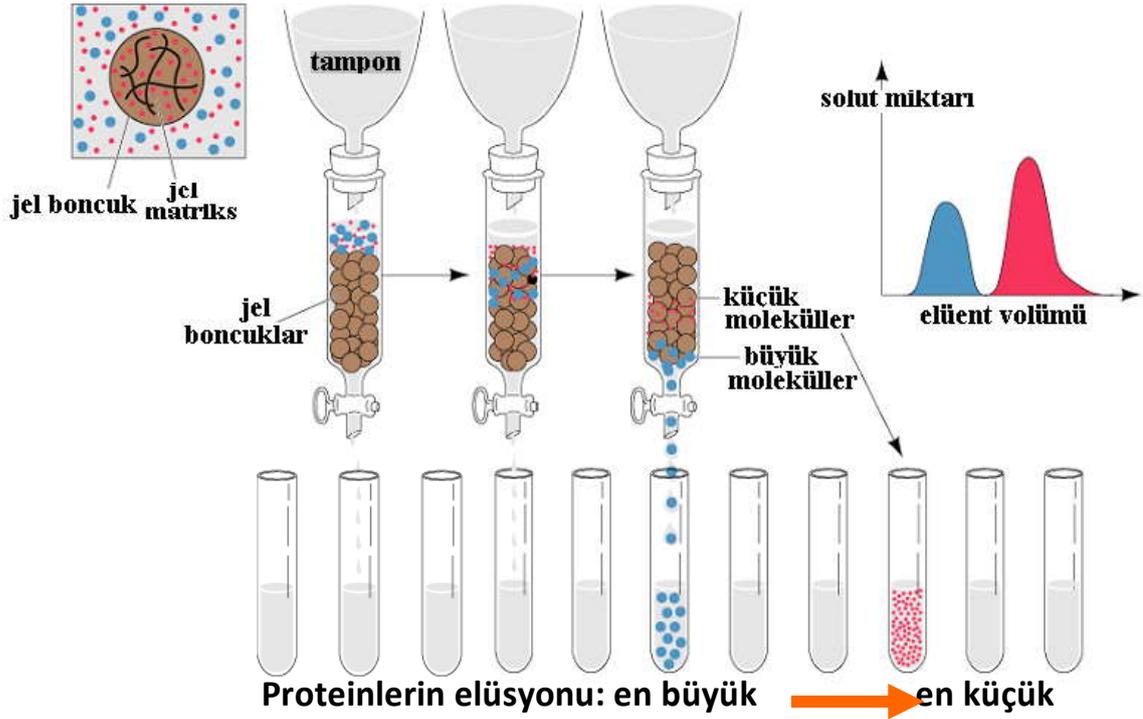
daha kısa kolon boyları tercih edilir. Tatbik edilen örnek hacmi önemli değildir, zira bağlanan proteinler konsantrasyondan fazla etkilenmezler.

1.4.6.6 Örnek Tatbiki ve Elüsyon

Örnek tatbik edilmeden başlangıç tamponu ile dializ edilmelidir. Sonuç hacmin önemi yoktur. Örneğin uygulanmasından sonra kolon hacminin iki katı hacimdeki başlangıç tamponu ile yıkanmalıdır ki bağlanmamış proteinin tamamı kolondan elüe edilebilsin. Bağlanan proteinler bundan sonra artan iyonik güçteki tamponla veya pH'ı değiştirilmiş tamponla (anyon değiştiricilerde pH düşürülerek, katyon değiştiricilerde pH yükseltilecek) veya hem pH'ı değiştirilerek hem de iyonik güç artırılarak elüe edilir. İyonik gücün değiştirilmesi genelde tercih edilir. Çünkü bu daha iyi kontrol edilebilir. Sonuç iyonik gücün 1,0 olması genellikle çoğu proteinleri elüe etmek için yeterlidir. Ya tampon konsantrasyonu artırılır ya da tampon konsantrasyonu sabit tutulurken diğer iyonlar örneğin sodyum klorür iyonları artırılır. Sodyum klorür iyonlarının artırılması genelde daha iyi bir yöntemdir. Çünkü tamponlama kapasitesi dolayısıyla pH ayırım boyunca sabit kalır (Johnstone ve Thorpe, 1982).

1.4.6.7 Jel Geçirgenlik Kromatografisi

Proteinler, molekül büyüklüğüne göre ayrılırlar. Kolon, jel boncuklar (sephadeks (çapraz bağlanmış dekstran) vb polisakkarid veya poliakrilamid polimer) ile doldurulur. Protein karışımını içeren tampon, kolondan geçirilir. Proteinlerin, matriksteki porlara takılma yüzdesi, büyüklüğü ile ters orantılıdır. Porlara takılan proteinler daha yavaş sürüklenirler. Büyük miktarda protein karışımı saflaştırılabilir.



Şekil 1.4.3 Jel geçirgenlik kromatografisi

Bu yöntem doğal ve yapay polimer karışımlarını ayırmada kullanılır. Bu yöntemde sabit faz gözenekli bir reçinedir. Reçineler büyük molekül ağırlıklı polimer maddelerdir. Gözeneklere girip çıkan küçük moleküller kolonu daha geç terk eder, gözeneklere girmeyen büyük moleküller kolonu önce terk ederek ayrılırlar. Burada ayırma molekül büyüklüğüne göre yapılır.

1.4.7 Elektroforez

Sulu bir çözelti içinde, süspansiyon ya da çözünmüş küçük elektrik yüklü parçacıkların, uygulanan bir elektrik alanının etkisi ile göç etmesi sürecine elektroforez denir. Bu küçük parçacıklar; bakteri hücreleri, virüsler, protein molekülleri veya sentetik parçacıklar olabilir. Doğal olarak bu parçacıkların çoğu elektrik yükü taşırlar (Yıldırım, 1985).

Diğer bir deyişle elektroforez ortam pH'sına göre, pozitif (+) ya da negatif (-) olarak yüklenen kolloid taneciklerin, bir elektrik alanında, kendi net yüklerine zıt yük taşıyan anot veya katoda doğru farklı hızlarda sürüklenmeleridir.

Bir çözeltide bir iyon elektrik alanı etkisi altında sabit hızla hareket yapar ve bu hız elektrik alan şiddeti ile orantılıdır, Nicel olarak,

$$\vec{V} = \mu \vec{E}$$

yazarız. Burada V iyonun hızı μ mobilitesi (hareketlilik) ve E elektrik alan şiddetidir. Mobilite ortam ve tanecik özelliklerine bağlıdır. Farklı iyonlar için farklı değerler gösterir.

Bir iyonun bir ortam içinde sabit hızla yayılması ve yayılma hızının iyonun biçimine bağlı olması biyolojide önemli bir uygulama yeri bulmuştur. Mobiliteyi birbirinden farklı iki cins pozitif iyon ihtiva eden bir çözelti düşünelim Aynı elektrik alanında aynı yönde kazandıkları hızlar birbirinden farklı olur. Hızların farklı olması belli sürelerde alınan yolların farklı olacağını ortaya koyar (Güner, 1979).

Yüklü makromoleküllerin elektriksel alan etkisinde göçlerinden yararlanarak, makromolekül karışımını ayırmak, özelliklerini ve konsantrasyonlarını belirlemek olanaklıdır. Protein moleküllerini ayırmak için, elektroforez yöntemi kullanılabilir. Çünkü, plazma proteinleri farklı molekül ağırlıklarına ve elektriksel özelliklere sahiptirler (Pehlivan, 1997).

Proteinler; elektrik yükü, büyüklükleri (yük/kütle oranı), şekil gibi özelliklerine göre ayrılırlar. Elektroforez, genellikle poliakrilamid jel üzerinde yapılır. Proteinlerin saflaştırılmasında kullanılmaz.

Elektroforez yönteminin değişik biçimleri vardır.

- Kağıt elektroforez
- Serbest veya hareketli cephe elektroforez
- Kuşak (zone) elektroforezi
- Disc elektroforezi:
- İzoelektrik odaklama
- SDS-Jel elektroforezi

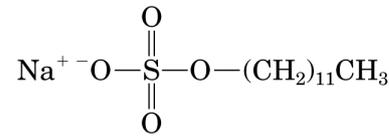
Elektroforetik yöntemler;

- Karışım içinde bulunan protein sayısını tespit etmek (kağıt ve jel elektroforezi)
- Saflaştırılmış proteinin saflık derecesini belirlemek (SDS-PAGE).
- Saflaştırılmış proteinin molekül kütlelerini tayin etmek (SDS-PAGE) amacıyla kullanılır.

1.4.7.1 SDS-Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jel, çapraz bağlı akrilamid polimeridir. İçeriğindeki akrilamid ve N,N'-Metilenbisakrilamid eklenen amonyum persülfat tuzunun sülfatıyla birleşerek polimerleşir.

Poliakrilamid jel elektroforezinde SDS-PAGE kullanılır. Burada SDS; Sodyum Dodesil Sülfat-anyonik deterjandır. PAGE ise poliakrilamid jel elektroforezinin kısaltılmış şeklidir.



Negatif yüklü SDS, proteinlerin kuarterner, tersiyer ve sekonder yapılarını bozar, katları açılan peptid zincir, SDS ile sarılarak misel görünümü kazanır. Zincirde yer alan her iki amino asit artığına bir molekül SDS bağlanır ve proteinlerin hepsi negatif yüklenir.

SDS-PAGE ile proteinler, net yük ve şekillerine göre değil, sadece molekül büyüklüklerine göre birbirinden ayrılırlar.

SDS'in bağlanmasıyla, doğal yapısını kaybeden proteinler, aynı şekil ve yük/kütle oranına sahip olurlar. Elektriksel alan içinde proteinlerin hareketi sadece mol kütlelerine bağlıdır. Daha küçük olanlar, daha hızlı sürüklenir ve proteinlerin alt üniteleri birbirinden ayrılır (<http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com>). SDS-polipeptid kompleksi, SDS ile hazırlanmış bir jele konduğunda, ortamdaki hızını belirleyen temel etken molekül kütesidir. Elektrik alanı sadece, filtrasyon olayının itici gücü görevini yapar. Bu yolla molekül ağırlığı saptanırken aynı koşullardaki paralel bir sistemde de molekül ağırlığı bilinen bir protein elektroforeze tabi tutulur. Daha sonra da bilinen ve bilinmeyen proteinlerin kendi jel kolonundaki konumları karşılaştırılarak bilinmeyen proteinin molekül ağırlığı saptanır (Çelebi, 2000). Sonuç olarak, elektroforez olayından tıpta, özellikle serum proteinleri incelenerek teşhis ve araştırmada yararlanılmaktadır. Belli bir pH değerli elektrolitik ortamda farklı

proteinlerin farklı mobilitelere sahip olması nedeni ile proteinlerin birbirinden ayrılabilmesi ve ayrıca biyokimyasal yöntemlerle nitel ve nicel analizlemenin yapılması mümkün olmaktadır (Güner, 1979).

Elektroforez, türlerin protein (çoğunlukla enzim) benzerliklerini değerlendirmeye yarayan bir tekniktir. Türlerin içerdikleri proteinlerin benzerliği genetik benzerliklerinin bir ölçüsü olduğundan bu teknikte karşılaştırılacak bireylerden alınan doku örneklerinden hücre zarlarını mekanik olarak parçalamak suretiyle suda çözünen proteinler elde edilir. Bu çözelti bir jel içine konduktan sonra, içinden elektrik akımı geçirilir. Her proteinin akıma moleküler büyüklük ve elektrik yüküne göre farklı yanıt vermesinden yararlanılarak dokular arasındaki farklar ve benzerlikler saptanabilir (Demir, 2009).

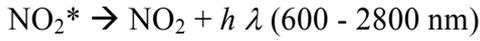
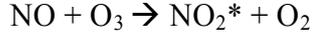
1.5 Moleküler Lüminesans Spektroskopisi

Çalışma ilkesi: Moleküler lüminesans spektroskopisinde, analit molekülleri, emisyon (floresans, fosforesans ve kemilüminesans) spektrumları kalitatif veya kantitatif bilgiler sağlayacak şekilde uyarılır.

Floresans ve fosforesans, uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerdirler. Bunun bir sonucu olarak, bu iki olay, sıklıkla daha genel bir terim olan fotolüminesans ile ifade edilir. Sonradan görüleceği gibi, floresans, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun spininde bir değişiklik oluşturmaması ile fosforesanstan ayrılır. Bunun bir sonucu olarak, floresans hemen yok olan bir lüminesans olup, kısa ömürlüdür. Buna karşılık fosforesans emisyonları ile ilişkili elektron spinindeki bir değişme, ışınlamanın bitmesinden sonra kolayca tespit edilebilir bir süre kadar, genellikle birkaç saniye veya daha uzun, ışımının sürmesine sebep olur. Birçok durumda, floresans veya fosforesans olarak foto lüminesans emisyonu, onu uyarmak için kullanılan ışımınınkinden daha uzun dalga boyundadır.

Lüminesansın üçüncü tipi olan kemilüminesans, bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşan uyarılmış bir türün emisyon spektrumuna dayanır. Bazı durumlarda, uyarılmış tür, analit ve uygun bir reaktif (ozon veya hidrojen peroksit gibi kuvvetli bir yükseltgen) arasındaki bir reaksiyonun ürünüdür. Bu durumda sonuç, analitin kendisinden çok, analitin veya reaktifin yükseltgenme ürününün karakteristik bir spektrumudur. Diğer durumlarda, analit kemilüminesans reaksiyonunda doğrudan yer almaz; bunun yerine, analitin bir kemilüminesans reaksiyonuna olan yavaşlatıcı veya katalitik etkisi analitik

parametre olarak iş görür. Fotolüminesans veya kemilüminesansın şiddetinin ölçümü, eser miktarlardaki önemli bazı inorganik veya organik türün kantitatif tayinini mümkün kılar. Günümüzde, florimetrik yöntemlerin sayısı, fosforesans ve kemilüminesans yöntemlerinin uygulamalarının sayısından önemli ölçüde daha fazladır.

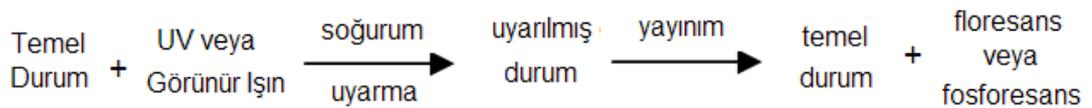


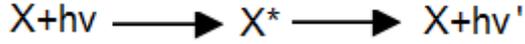
Kemilüminesansın analitik kimyaya uygulanması bağl olarak son yıllarda gelişmiştir. Kemilüminesans oluşturan kimyasal reaksiyonların sayısı azdır ve bu yüzden işlem bağl olarak az sayıdaki tür ile sınırlıdır. Ancak, kemilüminesans vermek üzere reaksiyona giren bileşiklerin bazıları önemli bileşikleridir. Bu nedenle, yüksek seçicilik, basitlik ve yöntemin aşırı duyarlılığı onun kullanımının son yıllarda artmasına yol açmıştır.

1.5.1 Floresans Spektroskopisi

Moleküler floresans spektroskopisi, optik yöntemlerden biri olan spektrofotometri ile ilgili analitik bir yöntemdir. Üzerine uygun dalga boyunda ışın yollanan molekül bu enerjiyi 10^{-15} saniye gibi çok kısa bir sürede soğurmakta ve uyarılmış duruma geçmektedir. Bu uyarılmış durumda molekül kararsızdır. Uyarılmış haldeki molekül, fazla enerjisinin bir kısmını ya da tamamını kaybetmeden; ancak $10^{-7} - 10^{-8}$ saniye kadar bu halde kalabilir. Uyarılmış durumundaki birçok molekül fazla enerjilerini komşu moleküllerle çarpışarak ısısal dağıtma ile harcar. Bazı moleküller ise bu fazla enerjilerini ışıma yaparak harcar ve temel duruma dönerler. Soğurulmuş ışının yeniden yayınması genel olarak **fotolüminesans** veya **lüminesans** olarak tanımlanır.

Fotolüminesans, floresans veya fosforesans yayma olmak üzere iki şekilde olabilir:





X: Molekül

h: Planck sabiti

v: Frekans

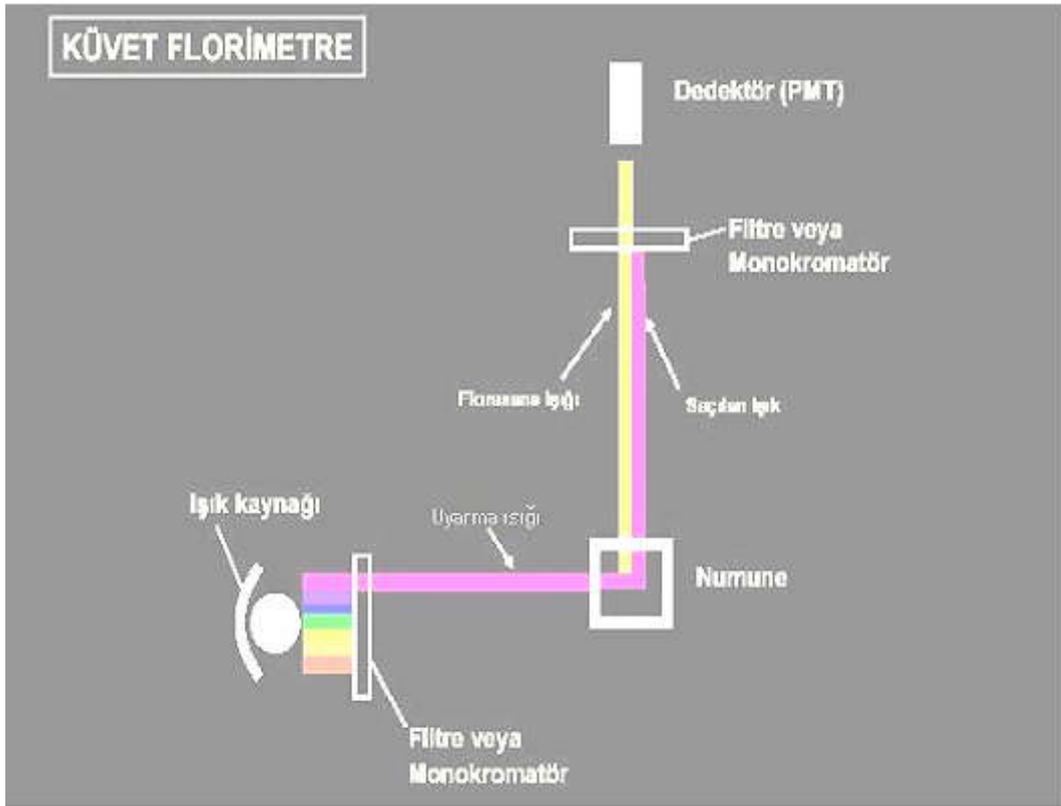
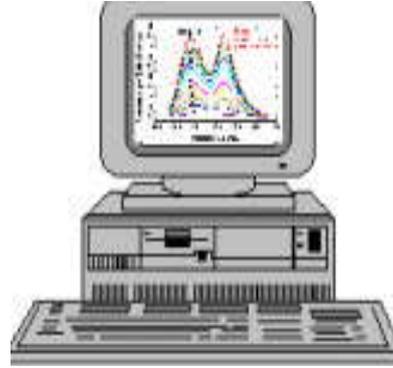
X*: Uyarılmış molekül

v': Salınım sırasındaki frekans

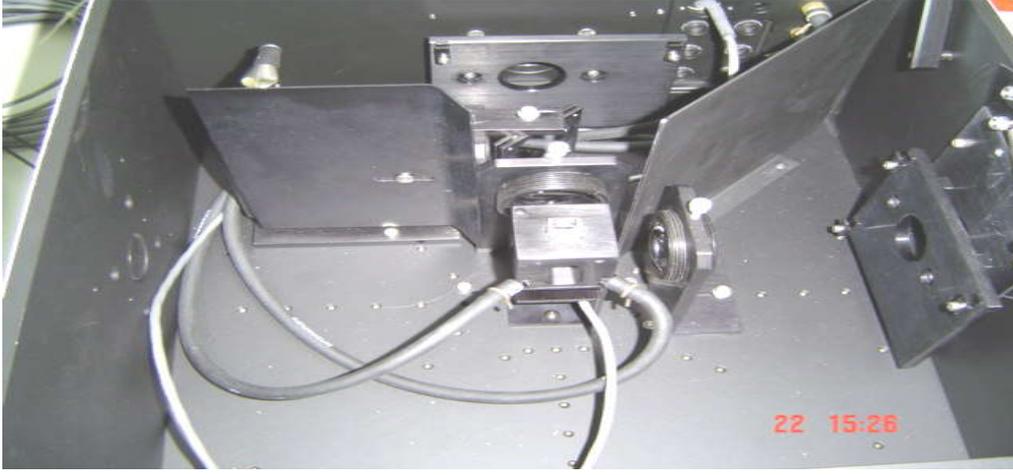
Molekülün uyarılmış durumundan temel duruma dönüş şekline göre **floresans** veya **fosforesans** yayma oluşur. Bir molekül soğurum ile temel elektronik ve titreşimsel durumdan uyarılmış haline geçer. Molekül uyarılmış durumda iken titreşimsel enerjisinin fazlası moleküller arası çarpışmalarla dağıtılır. Daha sonra molekül temel enerji seviyesine ya doğrudan doğruya bir ışın yayarak floresans oluşturur veya bir triplet seviyeye geçtikten sonra bir ışın yayarak döner. Bu seviyeden yayılan ışına ise fosforesans denir. Bu iki ışın yayma olayının ortaya çıkması için geçen zaman da farklıdır.

Floresans yayılması, molekülün enerjisi soğurmasından hemen sonra (yaklaşık 10^{-4} - 10^{-8} saniye) olur. **Fosforesans yayılması** ise daha yavaş ortaya çıkar. ($> 10^{-4}$ sn). Bu nedenle floresans gösteren birçok madde enerji kaynağı uzaklaştırıldıktan sonra görülmezken, fosforesans gösteren maddeler ışımaya devam edebilirler.

Floresans spektrometresinin iç kompartmanı şekil 1.5.2'de gösterilmiştir. Maddenin yaydığı floresans ışınının dalga boyu, madde için karakteristik olmasından yararlanılarak kalitatif analizi yapılır (şekil 1.5.1). Diğer taraftan yöntemin daha yaygın olarak kullanma alanı kantitatif tayinlerdir. Belirli bir derişim aralığında yayılan floresans ışınının şiddeti, derişimi ile orantılı olduğundan; bu maddelerin miktar tayinleri yapılabilmektedir.



Şekil 1.5.1 Spektrofluorimetrenin temel öğelerini gösteren şema



Şekil 1.5.2 Floresans spektrometresinin örnek kompartmanı

Floresans, hem gaz hem sıvı hem de katı haldeki sistemlerde ortaya çıkabilir. Floresansın en basit şekli seyreltik atomik gazda görülür. Gaz haline getirilmiş sodyum atomlarının 3s elektronları 589,6 ve 589 nm'deki ışının soğurumu ile 3p haline uyarılabilirler. Uyarılmadan yaklaşık 10^{-8} saniye sonra uyarılmış haldeki elektronlar normal seviyeye dönerken, soğurdukları ile aynı dalga boyunda ışın yayarlar. Bu çeşit floresansa **rezonans ışınım** veya **rezonans floresans** denir. Bu olay moleküller arası çarpışmanın olmadığı bazı katı maddelerde de olabilir. Bazı katı veya sıvı haldeki moleküller daha uzun dalga boyunda floresans yayma yanında aynı frekansta ışında yayabilirler (Rayleigh yayması).

Moleküllerin floresans yayma özelliklerinden geliştirilen moleküler floresans spektroskopisi yöntemi ile eser miktarlardaki birçok organik ve anorganik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizi yapılabilmektedir.

Yöntemin en önemli üstünlüğü soğurum yöntemine kıyasla çok daha az miktarlardaki maddelerin analizinin yapılabilmesi yani duyarlılığıdır. Ayrıca floresans gösteren maddelerin çok fazla sayıda olmaması yöntemin seçiciliğini diğerlerine kıyasla arttırmaktadır. Fakat diğer taraftan bu son özellik yöntemin uygulama alanını sınırlı tutmaktadır.

Floresans Spektroskopisinin Biyokimya ve İlaç Alanında Uygulama Alanları

- Protein yapısı
- Protein antikor etkileşimleri
- Donor-akseptör arası mesafe
- Proteinlerdeki ve membranlardaki enzim konfigürasyonu
- Membranların dinamiği ve yapısı
- Membranlardaki geçirgenlik ve iyon iletimi
- Membranlardaki lipid dinamiği
- Nükleik asitlerin yapısı ve dinamiği
- Fotofizik ve Fotokimya
- Uyarılmış bölgelerin karakterizasyonunda
- Molekül içi serbestlenmelerin tayininde
- Karışımların yapısı
- Karışımların reaksiyon kinetiği
- Elektron transferi
- Proton transferi
- Hidrojen bağlanması
- Difüzyon
- Moleküllerin dönme dinamiği
- Polimerlerin yapı ve dinamikleri
- Çözücü-çözünen etkileşimleri
- Yüzey çalışmaları

Petrol Araştırmalarında; Ham petrol karakterizasyonu

Çevresel Araştırmalarda; Kirliliğin araştırılması ve tanımlanması

Analitik Kimya;

- Floresans maddelerin kompleks yapılarının tanı ve çözülmesi

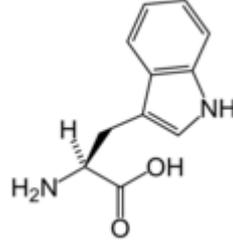
Farmakoloji;

- Biyolojik sistemlerle ilaçların etkileşimi
- Anestezi araştırmalarında

1.5.2 Protein Floresansı

1.5.2.1 Triptofan ve Türevler

Triptofan, proteinler içindeki en yüksek floresans özelliğine sahip olan amino asittir. Triptofan o kadar yaygın bir şekilde kullanılır ki, “doğal protein floresans” terimi çoğu zaman triptofan floresansı olarak adlandırılır.



Sulu çözeltilerde triptofan, yaklaşık 350 nm boyutuna ve yaklaşık 60 nm enine sahip geniş ve yapısı olmayan bir floresans bandı sergilemektedir. Farklı araçlar kullanılarak fakat aynı koşullar altında hesaplanan triptofan floresans spektrumunun, spektrum ölçümlerindeki farklılıklar yüzünden düşük seviyelerde olmak kaydıyla farklı şekiller ve genişlikler (348-353nm) kazandığını belirtmek gerekmektedir. Maalesef, yakın-ultraviyole bölgelerindeki aletlerin spektrum ölçümleri için günümüzde henüz genel geçerliliği olan standartlar bulunmamaktadır. Dipolar anlardaki (yaklaşık 4D) büyük artışın nedeni uyarım olduğundan dolayı, emisyonadaki değişiklikler daha kuvvetlidir. Bu değişiklik, kromofor dipolünü ve çözücü dipolleri içeren yönelim gevşeme süreçlerinden kaynaklanmaktadır. Triptofanın emisyonunun çevrenin hareketliliğine ve kutuplaşmasına karşı olan bu duyarlılığı, protein yapıları ve dinamikleri çalışmalarında triptofan floresansını önemli bir araç haline getirmektedir.

Hemen hemen bütün kutuplu protein grupları bir ölçüde triptofan floresansını söndürebilir. Fotoiyonlaşma, sistem arası çaprazlaşma, uyarılmış yapılanma, uyarılmış alan protonu ve uyarılmış alan elektron transferi muhtemel ışımaz süreçler arasında bulunmaktadır. Aspartik ve glutamik asit amino asitinin nötr halde bulduklarında çok etkili dinamik söndürücülerdir. Lizin ve arginin de dinamik söndürücülerdir, fakat bunlar yüklü halde bulduklarında daha etkilidirler. Düşük pH değerine sahip histidin, indol halkasıyla karmaşık dizilimli bir yapı oluşturarak söndürücü etkiye sahip olabilmektedir. Daha düşük etkinlikte olmak kaydıyla, protona sahip olmayan histidin de triptofan floresansını söndürebilmektedir. Tek sisteinin de etkili bir söndürücü

olmasına rağmen, disülfür de triptofan floresansının en güçlü söndürücülerinden biridir. Bunlara ek olarak, amit ve peptit gruplarının da dinamik söndürücüler olarak hareket ettikleri gösterilmiştir. Triptofan emisyonunun ve hem emiliminin spektrum örtüşümünden dolayı, hem-içeren proteinlerde uzun-dizimli enerji transferi sönümü çok önemlidir. Bu gibi etkiler protein floresansı analizlerini karmaşık hale getirirse bile, bunlar çok önemli yapısal bilgilerin elde edilmesi süreçlerinde kullanılmaktadır. Örneğin, membrana bağlı sitokromda (b₅) bulunan Trp-109 hem-söndürücü iki protein alanı arasındaki mesafe dağılımının hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Triptofan; oksijen, hidrojen peroksit, iyadür, bromür, akrilamit, süksinimit, dikloroasetamit, piridinyum hidroklorid, NO₃⁻, Cs²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺ ve Mn²⁺ gibi birçok madde tarafından meydana gelen söndürmelere karşı gerçekten çok duyarlıdır. Söndürücülere karşı olan bu duyarlılık, söndürme ölçümleri yardımıyla proteinlerdeki triptofan amino asitlerinin ulaşılabilirliğini ve erişilebilirliğinin belirlenmesini sağlamaktadır.

1.5.2.2 Diğer Doğal Floresanslar

En yüksek floresans özelliğine sahip olan ikinci amino asit ise, tirozindir. Fakat tirozinin uygulanması çoğu zaman triptofan içermeyen proteinlerle sınırlıdır. Fenilalanin floresansı çok zayıftır ve protein çalışmalarında hemen hemen hiç kullanılmamaktadır. Diğer bir doğal floresans sınıfı, en bilindikleri NADH'e (indirgenmiş β-nikotinamid adenin dinükleotid) olan kofaktörleri içermektedir.

NADH'nin floresans özellikleri birçok çalışmanın konusu olmuştur. Sulu çözeltilerde, floresansın kuantum verimi çok düşüktür ve molekülün konformasyonundan dolayı floresansın yaşam süresi subnanosaniye dizini içerisindedir. Karaciğere bağlı olan alkol dehidrojenazı, floresansta ve emilimdeki maviye kayan bir spektruma neden olurken kuantum verimindeki artışında sebebidir. Substrat analog izobütiramit ile üçlü bir bileşik oluşumu bu etkinin boyutlarını daha da artırmaktadır. NADH'lerin yaşam süresi dağılımları, nanosaniye dizilim içinde değişiklik göstermektedir. NADH'lerin yaşam süresi dağılımları, ikili ve üçlü bileşiklerde uyarılmış bir alan reaksiyonunu ifade eden karmaşık bir değişime maruz kalmaktadır.

Proteinlerdeki amino asitlerin var olan floresans özellikleri, kimyasal denatüranlar, sıcaklık, pH değişimleri ve basıncın neden olduğu katlanma/katlanmama geçişlerinin izlenmesi amacıyla uzun zamandır kullanılmaktadır. Özellikle triptofan

artıklarının floresan özellikleri protein yapısının bozulmasına etkin bir şekilde duyarlıyken, fenilalanin ve tirozinin düşük miktardaki ürünleri ve bunların problemleri bu tür çalışmalar için bir dereceye kadar daha az duyarlıdır.

Floresans özelliklerdeki değişimler, protein katlanmış ve katlanmamış profillerinin kinetik ve denge düzenlemelerinde çok yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen bu değişimlerin fiziksel açıklamalarının detaylarına nadiren rastlanmaktadır.

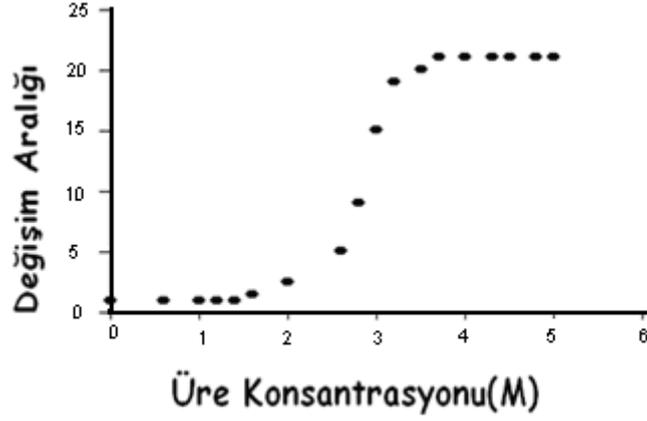
Genel olarak proteinin katlanması iki basamaklı prosesle iyi bir şekilde anlatılmıştır ve floresans özelliğinin izlenmesiyle elde edilen bilgiler (profiller), sirküler dikroizm ile elde edilenlerle uyumludur. Böyle durumlarda, floresans profilleri protein yapısındaki genel hasarların indikatörleri olarak alınırken, bunlar triptofan artıklarının yerlerinin değişmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak bir çok çalışmada floresans katlanma/katlanmama profilleri, özellikle triptofan artıklarının yerlerindeki yapısal değişikliklerden kaynaklandığından, 2 basamaklı olmayan davranışla açıklanmaktadır (Banik ve ark.,1992, Mann ve ark., 1993). Bu nedenle bazı durumlarda floresans profilleri katlanma/katlanmama geçişlerinde geçici ve sabit ara ürünler hakkında bilgiler verilmektedir.

Son yıllarda bir ve iki triptofan içeren proteinlerin doğal durumlarında var olan floresansın tanımlamasında çok büyük ilerlemeler kaydedilmiştir (Szabo ve ark., 1985). Proteinlerin floresans özellikleri oldukça karakteristiktir. Proteinlerin hem doğal hem de denatüre durumları arasındaki farklılıklardan dolayı, proteinlerin doğal ve denatüre durumlarının relatif ürün miktarı oranları arasında yaygın olarak değişkenlik göstermektedir. Örneğin; bazı proteinlerde doğal durumda triptofan emisyonu yüksek oranda söndürülmektedir (Örnek; heme proteinleri). Böyle katlanmamış floresans süresi ve şiddetinde büyük artışlara yol açmaktadır. Diğer yanda, diğer proteinlerde doğal durumda triptofan nispeten yüksek miktardaki ürün iken, katlanmamış durumda floresansı etkin şekilde söndürülmüştür. Yukarıdaki verilen referanslar, tek triptofan içeren proteinlerin floresans düşüşlerinin tek eksponansiyel düşüşle nadiren açıklanabilir ve düşüş hızlarındaki bu heterojenliğin katlanmış yapılarıdaki konformasyonel durumların heterojenliğini yansıttığını göstermektedir.

Şimdiye kadar, kararlı durum floresans şiddetlerinin tek dalga boyundaki emisyonlarındaki değişimlerinin ölçümleri yeterince bilgi verici değildir. Ancak izlenebilir olarak protein katlanmalarında floresans kullanımı genellikle basittir. Protein yapılarının indikatörleri olarak başlıca üç parametrenin izlenmesi gereklidir. Bu üç parametre; emisyonun şiddeti ortalama enerji veya emisyonun ortalama dalga boyu ve

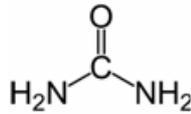
polarizasyondur. Daha detaylı ve iyi çözümlenmiş bilgiler elde edebilmek için bu parametrelerin karalı durum modu gibi zaman çözümlenmede araştırılmadır.

SSa1 proteinde triptofan olmamasına rağmen altı tane tirozin kromoforu vardır. Floresans spektrumu ise bize bu kromoforik yapıları hakkında bilgi verir.



Şekil 1.5.3 SSa1'in üre ile denaturasyon eğrisi

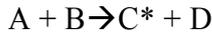
Başta sabit bir şekilde devam eden eğrinin ilk kısmı, eklenen ürenin proteini denature etmeye başladığını, daha sonra yükseliş gösteren eğrinin ikinci kısmı ise denature olan proteinin kromoforik yapılarından kaynaklı bir sinyal artışının meydana geldiğini gösterir. Son olarak da yine sabit bir şekilde devam eden üçüncü kısmı ise artık proteinin tamamen denature olduğunu göstermektedir. Peki, üre neden proteini denature eder? Çünkü ürenin yapısı proteine oldukça benzerdir. Yapısındaki NH bağı ve CO bağı üreyi protein yapısına benzer kılar.



Proteinin üçüncül yapısını alabilmesi için gerçekleştireceği zayıf bağlanmaları engeller ve dipeptitlerin oluşmasına engel olur. Bundan dolayı protein gerekli yapıyı alamaz ve denature olur (Bardwell ve Craig, 1987).

1.5.3 Kemilüminesans Olayı

Bir kimyasal reaksiyon, temel haline dönerken, ışık yayan veya enerjisini daha sonra emisyon yapacak başka bir türe aktaran, elektronik olarak uyarılmış bir tür verdiği zaman kemilüminesans meydana gelir. Kemilüminesans reaksiyonlarına çok sayıda biyolojik sistemde rastlanır ve bu olaya genellikle *biyolüminesans* adı verilir. Biyolüminesans gösteren türler için örnekler, ateşböceği, deniz menekşesi ve bazı deniz anaları, bakteriler, tek hücreli hayvanlar ve kabuklu hayvanlardır. Çeşitli doğal biyolüminesans olaylarının kimyası tam olarak anlaşılamamıştır.



Kemilüminesans ölçmeleri için cihaz, oldukça basittir ve sadece uygun bir reaksiyon kabı ve bir fotoçoğaltıcı tüpten ibaret olabilir. Genel olarak, tek ışın kaynağı, analit ile reaktif arasındaki kimyasal reaksiyon olduğundan, dalga boyu seçici cihazına gerek yoktur. Zamanın bir fonksiyonu olarak, bir kemilüminesans deneyinden elde edilen tipik sinyal, reaktif ve analitin karıştırılması tamamlandığında, hızla en yüksek değere ulaşır; sonra sinyalin daha az veya daha çok üstel bozunması takip eder. Kantitatif analiz için ekseriya sinyal sabit bir zaman periyodu için integre edilir ve aynı yolla işlem görmüş standartlar ile karşılaştırılır. Alternatif olarak, pik yükseklikleri de kullanılır. Sinyal ve derişim arasında geniş bir derişim aralığında genellikle doğrusal bir ilişki vardır. Kemilüminesans yöntemleri genellikle yüksek duyarlılığa sahiptirler. Çünkü gürültü yokluğunda düşük ışık seviyeleri bile kolayca izlenebilir. Ayrıca, bir filtre veya monokromatör ile ışının zayıflaması söz konusu değildir. Gerçekte gözlenebilme sınırları genellikle dedektör duyarlılığı tarafından değil, reaktifin saflığı tarafından belirlenir. Tipik gözlenebilme sınırları milyarda bir (bazen daha az) ile milyonda bir aralığındadır.

Ozon, azot oksitler ve kükürt bileşikleri gibi atmosferik kirleticilerin tayini için yüksek duyarlılık ihtiyacı sonucu, gaz bileşenlerinin tayini için kemilüminesans yöntemleri ortaya çıkmıştır.

Sıvı fazda analizlerde kemilüminesans gösteren organik maddeler yardımıyla inorganik türlerin analizi yapılır.

Kemilüminesans reaksiyonlarının seçiciliğini artırmak, yöntemi kemilüminesans reaksiyonlarında doğrudan yer almayan analitlere de uygulayabilmek için, istenen analitin substrat olduğu ve ürünlerden birinin kemilüminesansla tespit edildiği bir enzim reaksiyonundan sonra bir kemilüminesans basamağının yürütülmesi yaygın bir uygulamadır.

1.6.Biyolüminesans

Biyolüminesans, organizmalarda kimyasal bir reaksiyon ile ışık üretimidir. Biyolüminesans, fosforesans ve floresans olaylarından farklıdır. Bir ışık kaynağından absorbe edilen ışık floresans ve fosforesansta değişik dalga boyunda farklı bir ışımaya olarak yansıtılırken, biyolüminesansta ise ışık oluşumu için gerekli enerji kimyasal bir reaksiyonla hücre içinde sağlanır. Bazı karasal canlılarda (örneğin ateş böcekleri, bazı şapkalı mantarlar, bazı toprak solucanları, vb.) da görülmekle birlikte, biyolüminesans esas olarak deniz canlılarında görülür. Okyanuslarda yaşayan organizmaların %90'dan fazlasının biyolüminesans özelliğe sahip olduğu bilinmektedir. Biyolüminesans, derin denizlerin başlıca ışık kaynağıdır. Eskiden endişe ve korku ile izlenen bu olay, günümüzde doğanın en büyüleyici ve harika olaylarından biri olmuştur (Gitelson ve Levin, 1999).



Şekil 1.6.1 Ateş Böcekleri

Bir organizmanın ışık çıkarmasının temel nedeni halen kesin olarak belli olmamakla birlikte, çoğu kez yaşamsal fonksiyonlardan üreme, beslenme, savunma ve iletişim kurma ile ilgili olduğu görülmüştür. Bu nedenle, denizlerde yaşayan değişik gruplardaki canlıların, yaşamını sürdürmek amacıyla farklı zamanlarda ışık oluşturan benzer yapıdaki sistemleri geliştirdikleri saptanmıştır (Hastings, 1983, Herring, 1987).

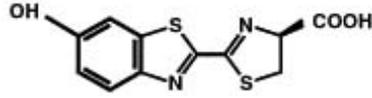
Tüm biyoluminesans reaksiyonları için genel olarak bilinen birkaç ortak özellik vardır. Bunlardan birincisi oksijenin olmasıdır. İkincisi lusiferin ve lusiferaz gibi iki kimyasal maddenin gerekli olduğudur. Lusiferin reaksiyon için temel substrat olup, ışık üretimini sağlar. Lusiferaz ise bir enzim olup lusiferini okside eder ve ışık ile inaktif oksilusiferin oluşturur. Çoğu organizmada lusiferinin yenilenmesi beslenmeyle bağlantılıdır veya içsel olarak yaşamsal faaliyetleri için sentezlenmektedir. Birçok deniz canlısında lusiferin ve lusiferaz “Fotoprotein” denilen bir yapı içinde birlikte bulunmaktadır (örneğin Aequorea’da aequorin ve GFP= green fluorescent protein; Obelia’ da obelin; kalamarlardaki symplectin; Pholas’da Pholasin, vb.) (Reichl v.d. 2000). Fotoproteinlerden ışık oluşturulması Coelenteratae’da genellikle Ca^{2+} gibi bir iyonun sisteme eklenmesiyle tetiklenmektedir. Fotoproteinleri taşıyan yapılar fotosit ya da fotofor olarak da adlandırılır. Biyoluminesansta salınan enerji çoğu kez ışık formunda olduğu için, biyoluminesanse “soğuk ışık” adı verilmektedir (Hasting, 1996; 1983; George ve Philips, 1997).

Lusiferin tipleri

Denizlerdeki yüzlerce çeşit lüminoz canlı olmasına karşın, ışık oluşumunun temel maddesi olan lusiferinin ilginç bir şekilde sadece birkaç tipi bulunmaktadır. Lusiferinin bilinen 5 ana tipi bulunur.

Bunlar:

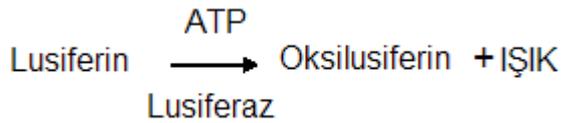
- 1) Bakteriyel lusiferin: Redüklenmiş riboflavin fosfat ($FMNH_2$) tır; bakteriler, bazı balıklar ve kalamalarda görülür.
 - 2) Dinoflagellat lusiferini: Klorofile benzer bir yapı gösterdiği için klorofilden türevlendiği düşünülür. Dinoflagellatlar ile krillerde bulunur.
 - 3) Vargulin lusiferini: Ostrakod’ lardan Vargula’da bulunur.
 - 4) Sölenterazin: En yaygın görülen lüsiferin tipidir. Birçok filumda görülür (Radiolaria, Ctenophora, Cnidaria, Cephalopoda, Copepoda, Chaetognatae, bazı balıklar ile karideslerde bulunur).
 - 5) Ateş böceği lusiferini: Reaksiyonda kofaktör olarak ATP’ye gereksinir. Ateş böceklerinde bulunur (Haddock ve ark., 2000; Jones ve ark., 1999).
- Lusiferin’in ateş böceği tipi,



Lüminoz Canlılar: Biyoluminesans olayı, deniz canlılarından bakteriler ve tek hücreli protistlere, kalamar ve balıklara dek hemen hemen her organizma grubunda görülür. Biyoluminesansın çeşitliliği hakkında fikir sahibi olmak için aşağıda belirtilen lüminoz canlılar listesine bir göz atmak yeterlidir. Bu listede belirtilen gruplar tümüyle olmasa bile en azından bir türüyle biyoluminesanstır (Haddock, vd. 2000). Lüminoz olan canlı grupları: Bakteriler , Funguslar , Dinoflagellatlar, Radiolaria - Işınlılar, Cnidaria (Coelentarata), Scyphozoa (=Gerçek Medüzler), Hydrozoa (=Hidra-lar), Anthozoa (=Mercanlar, Deniz şakayıkları), Ctenophora Nemertinler (=Kur-dela kurtları), Mollusca (=Yumuşakçalar), Deniz minaresi (bir tür), Nudibranchia (birkaç) (=Deniz sümüklü böceği), Kalamarlar (birçoğu), Octopoda (birkaç) (=Ahtapotlar), Annelida (birkaç) (=Halkalı solucanlar), Toprak Solucanları, Pycnogonidler (=Deniz örümcekleri), Crustacea, Copepoda, Ostracoda, Amphipoda, Euphausidae (=kriller), Chaetognatae (1 tür) (=Kılıç çeneliler), Echinodermata (=Derisidikenliler), Asteroidea (=Deniz Yıldızları), Ophiuroidea (=Yılan Yıldızları), Holotharidea (=Deniz Hıyarları), Hemicordata (=Yarım Kordalı Kurtlar), Urochordata (=Kuyruğu kordalılar), Pyrosomae, Tunicata (1 tür) (=Tulumlular), Larvacea, Chordata, Köpekbalıkları, Balıklar, Centipedeae (=Çıyanlar), Millipedeae (=Kırkayaklar), Insecta (=Böcekler), Ateş böcekleri, Elanteritler, Mantar tatarcığı, Işıklı kurtlar.

Biyoluminesansın Çalışma Prensipli

Biyoluminesansın temel reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



1.7 Amaç

Metabolik düzene yapılan etkiler organizmalar tarafından uygun seviyeye getirilmeye çalışılır. Kimyasal döngüler birbirlerini etkiledikleri için metabolik yanıtı tahmin etmek zordur. Biyokimyasal süreçler model organizmalar (C. Elegans, Drosophila, hamster, sıçan gibi) kullanılarak çalışılmıştır. Model organizmalar seçilirken ortam ve stres kaynakları göz önünde bulundurulmuştur. Romatizma çalışmaları için nemli yerlerde yaşayan sıçanlar seçilmiştir. Ortamdaki stres faktörü, nem, sıçan tarafından

metabolizmasının çalışmasını etkilemeyecek hatta faydalı olabilecek seviyeye getirilmiştir. Günümüzde organizmalar, sanayi ve teknolojinin getirdiği negatif etmenlerden dolayı farklı stres kaynakları ile başa çıkmak zorundadır. Ozon tabakası delinmesi sonucu ortaya çıkan faktörler, beslenme bozukluklarından dolayı ortaya çıkan ve dolaylı yoldan etki eden faktörler bu stres kaynaklarına örnek olarak verilebilir.

Sürekli sıcaklık, besin eksikliği, oksijen eksikliği ve basınç gibi streslere maruz kalan kaplıca balıkları hastalıklar ve aging araştırmalarında potansiyel olarak iyi bir canlıdır. Bu balıkların biyolojisinin ve fizyolojisinin stres yanıtı ve aging moleküler mekanizmasının tespiti gelecekteki çalışmalar için esas oluşturacaktır.

Hsp70 proteinleri polipeptitlerin kararlı konformasyona erişmesine de yardımcı olurlar. Hücre için hayati öneme sahip olan bu makro moleküller peptitlere bağlandıkları zaman ATP hidrolizlerini artırır ve peptitin üçüncül yapısını bulmasına yardım ederler. Aynı zamanda ATP hidrolizi de peptite bağlanmayı artırır. Hsp70, proteinlerin üç boyutlu yapıya erişmesini ve proteinlerin bu yapılarını korumasını sağlayan, türler arasında evrensel olarak bulunan önemli bir proteindir. Bu protein translasyon, membranlar arasında protein taşıma ve kltrin parçalanması gibi hücresel görevlerine ilaveten üçüncül yapılarına kısmi olarak erişmiş proteinlere bağlanıp agregasyonu önleyerek hücreleri stresten korur. Tüm bu farklı fonksiyonlar substratın proteine bağlanma ve salınmasına bağlı olarak düzenlenmiştir. Hsp'lerin normal görevleri hücre içerisinde (proteinlerin katlanmasına yardım ederek ve proteinlerin hazırlanmasını düzenleyerek) her proteinin bağlayıcı olmasını sağlamaktadır. Hsp'ler hücre içerisindeki peptidleri kuşatarak sınırlandırılmalarını sağlar. Hücre içerisinde peptitler Hsp' ler ile alınır. Bu proteinler hücresel şaperonlar gibi fonksiyon görürler, protein sentezinde ve taşınmasında rol oynarlar. Stres boyunca çok sayıdaki enzim ve yapısal proteinde zararlı yapısal ve fonksiyonel değişim meydana gelmektedir. Bu sebeple stres altında bulunan hücrelerin hayatta kalmasında, proteinlerin kendi fonksiyonel konformasyonlarını sürdürmek, doğal olmayan proteinlerin toplanmasını önlemek, denatüre proteinlerin yeniden yapılanması ile tekrar fonksiyonel yapılarına dönmeleri ve fonksiyonel olmayan ama zararlı olabilecek peptidlerin ortadan kaldırılması önemlidir. Böylece, Hsp/şaperonlar hücresel korumada tamamlayıcı rol oynamak ve bazen bir arada çalışmak suretiyle proteinleri stresten korumaktadır. (Wang ve ark., 2004).

Balık organizmalarda stresi çalışmak için iyi bir modeldir. *Cyprinion macrotomus* (vurucu) ve *Garra rufa obtusa* (yalayıcı) Sivas balıklı kaplıcada yaşayan iki Cyprinidae türüdür. Bu ortamda birçok zorluk, yüksek basınç, düşük oksijen miktarı, aşırı sıcaklık, besin kıtlığı, ağır metaller ve enfeksiyon sürekli fizyolojik stres oluşturur.

Bu çalışmada öncelikle *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa*'nın beyaz kaslarından DEAE kolon kromatografisi kullanılarak Hsp70 saflaştırılması amaçlanmıştır. Daha sonra bu Hsp70 protein çözeltileri lüsiferaz katlanma oranı lüminometre ile ölçülecektir.

İki tür balıktan saflaştırılan protein çözeltileri ATPaz aktivitesini belirlemek amacıyla ATPaz reaksiyonu sonucunda substrat olan ATP'nin, ADP ve inorganik fosfata (Pi) parçalanmasıyla açığa çıkan Pi kolorimetrik olarak molibdat çöktürmesiyle belirlenecektir. Sonrasında saflaştırılan protein çözeltilerinin ADP varlığında ve yokluğunda florimetrik deneylerle denatürasyon eğrileri oluşturulup Gibbs enerjileri hesaplanacaktır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1 Deneylerin Yapıldığı Yer ve Tarih

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya A.B.D. Doç. Dr. Yusuf TUTAR' ın laboratuvarlarında Aralık 2008 – Aralık 2009 tarihleri arasında yapılmıştır.

2.2 Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler; agar, akrilamid, amonyum persülfat (APS), bisakrilamid, N,N,N'N' – tetrametiletilendiamin (TEMED), sodyum dodesil sülfat (SDS), dietilaminoetil (DEAE) reçine, sığır serum albümini (BSA), sodyum klorür (NaCl), HCl, tris, agaroz, yükleme çözeltileri (Comassi Blue, Brilliant blue), metanol, etanol, merkaptotanol, izopropanol (merck), EDTA (etilen daimin tetra asidik asit), PMSF (fenil metil sülfonil florid) (carlo erba), asetik asit, kolonlar, bütanol, gliserol (merck), üre, MgCl₂, ATP, Mohr tuzu (ferrik amonyum sülfat = FAS·6H₂O), TCA, Tiyoüre, H₂SO₄, amonyum molibdat ((NH₄)₆ MO₇ O₂₄ 4H₂O), potasyum fosfat (KH₂PO₄) (carlo erba).

2.3 Kullanılan Cihazlar

Deneyde Spektroflorimetre (Shimadzu RF5301), çalkalamalı karıştırıcı (Selecta) , pH metre (Orion 250 A), manyetik karıştırıcı, santrifüj (Eppendorf), analitik terazi (Gecavery), otomatik pipet (Gilson), özel cam kolonlar, fraksiyon toplayıcı, peristaltik pompalar (Pharmacia Biotech), elektroforez cihazları (Labnet International, Inc. Edison, Nj, USA Model power station 300-220V), Ultra turrax homojenizatörü, lüminometre (Biofix lumi-10 Macherey–Nagel luminometer) ve otoklav (nüve) kullanılmıştır.

2.4 Hsp70 in Tris Tamponu Kullanılarak Homojenize Edilmesi ve Saflaştırılması

2.4.1 Homojenizasyon (TRIS) Tamponunun Hazırlanması

10 mmolL⁻¹ TRIS(H₂NC(CH₂OH)₃), 10 mmolL⁻¹ NaCl, 1 mmolL⁻¹ PMSF (Fenil metil sülfonil florid) ile 1000 ml lik tris tamponu pH 7.5 olmak üzere hazırlandı.

2.4.2 Homojenizasyon İşlemi İçin Balıkların Hazırlanması

Ağır metal, pH, selenyum, sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği etkilerinin sonucunda -20 °C sıcaklıkta saklanan balıklar çözündürüldükten sonra steril bir bisturi kullanılarak yüzgeç, kuyruk ve baş kısımları ayrıldı. Karınları açılarak iç organları çıkarılıp, kasları küçük parçacıklar haline getirildi ve örnekler tartıldı. Herhangi bir aktivite kaybına sebebiyet vermemek için bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi.

Protein saflaştırması için kullanılacak olan balıklar küçük parçalara ayrılarak balıkların kasları önce 1/1 (w/v) oranında serum fizyolojik (% 0,9 NaCl) ile üç kez yıkandı. Yıkanan balık kasları üzerine 1/1 (w/v) oranında Tris tamponu (10 mmolL⁻¹ Tris-HCl, pH =7,5, 10 mmolL⁻¹ NaCl, 0,1 mmol L⁻¹ EDTA, 1mmolL⁻¹ PMSF) eklenerek bir kez daha yıkama işlemi gerçekleştirildi (Sean ve Gretchen, 2001) ve üzerine tekrar 1/1 (w/v) oranında tris tamponu eklenerek buz üzerinde Ultra Turrax homojenizatörü kullanılarak 9500-13500 (dk⁻¹) aralığında 5 dakika homojenize edilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Homojenize edilen örnekler Eppendorf –Cantrifüje 5810R santrifüj cihazında 4 °C sıcaklıkta 1200 rpm’de, 30 dakika santrifürüj edildi ve elde edilen süpernatantlar ayrılıp sterilmiş edilmiş eppendorf tüplere alındı.

2.4.3 Hsp70 in DEAE Kromatografisi Kullanılarak Saflaştırılması

3 tane ependorf tüp alınarak her birine 7 şer mL DEAE eklendi. 2000 rpm de 3 dakika santrifüjlendi. Üzerindeki sıvı dikkatlice akıtıldı. Her bir tüp Tris tamponu ile 30 ml ye tamamlandı. Tekrar 2000 rpm de 3 dakika santrifüjlendi. Bu işlem üzerindeki sıvı alınarak iki defa tekrarlandı. Kalan reçinelerden her bir tüpe balıkların beyaz kasları homojenize edilerek elde edilen süpernatantlar eklendi. 1 saat çalkalayıcıda çalkalandı.

Tris tamponununun 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 M lık NaCl tuz çözeltileri hazırlandı. Reçineye tutturulan proteinler kolona yüklendi. Fraksiyon toplayıcı ve peristaltik pompa da düzeneğe yerleştirildi. Değişik derişimlerde tuz çözeltileri bir tuz gradienti oluşturmak için kolondan geçirildi. Bu şekilde proteinlerin ayrılması ve kolondan sıyırılması sağlandı. Fraksiyon toplayıcı ile kolondan örnekler toplandı. Birbirinden ayrılmış proteinler kolondan farklı zamanlarda çıktığından karışım halinde bulunan proteinler birbirinden ayrılmış oldu. Fraksiyon toplayıcı ile ayrılmış olan protein örnekleri UV-spektroskopisinde 280 nm dalga boyunda absorpsiyonları okundu. Yüksek değerli pikler veren fraksiyonlar poliakrilamid jele yüklendi (SDS-PAGE). Bu işlem *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa* için ayrı ayrı yapıldı. Saflaştırmanın devamında jel geçirgenlik kromatografisi uygulandı.

2.4.4 Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

SDS-PAGE jeli, ayırma (alt jel) ve derişim jeli (üst jel) olarak adlandırılan iki farklı jelden oluşmaktadır.

Ayırma Jeli (Alt Jel)

- ✓ 750 µl distile su
- ✓ 3750 µl 0,75 M Tris-HCl, pH 8,8/ %0,2 SDS
- ✓ 3 ml Akrlamid/ Bisakrlamid (19:1)
- ✓ 90 µl %10 APS
- ✓ 6 µl TEMED

Derişim Jeli (Üst Jel)

- ✓ 1050 µl distile su
- ✓ 1500 µl 0,25 M Tris-HCl, pH 6,8 / %0,2 SDS
- ✓ 390 µl Akrilamid / Bisakrilamid
- ✓ 60 µl %10 APS
- ✓ 3 µl TEMED

SDS-PAGE camları su ve deterjan yardımıyla temizlendi. Yüzeyinde herhangi bir partikül veya suyun kalmaması için % 70'lik alkol çözeltisiyle silindi. Daha sonra, SDS-PAGE için gereken düzenek kuruldu (BIORAD Miniprotean dikey elektroforez sistemi). Camların arasına ilk önce 3,2 ml ayırma jeli döküldü. Düz bir yüzey elde etmek ve jelin havayla temasını önlemek için bir enjektör yardımıyla jelin yüzeyi su ile doygun bütanol ile kapatıldı. Ayırma jeli polimerize olduktan sonra su ile doygun bütanol uzaklaştırıldı ve jel bu kez distile su ile yıkandı. Yıkama sonrasında kalan su, küçük parçalar halinde kesilmiş 3 MM Whatman kağıdıyla alındı. Bu işlemlerin ardından hazırlanmış olan derişim jeli ayırma jelinin üzerine döküldü ve tarak hızlıca yerleştirildi. Böylece yüklemenin yapılacağı kuyular açılmış oldu. Derişim jelinin polimerleşmesi ve kuyuların oluşumu için yeterli bir süre (yaklaşık olarak 20 dakika) bekledikten sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Kuyular, örneklerin jele girişinde sorun olabilecek her türlü kalıntının uzaklaştırılması için 1x SDS-PAGE yürütme tamponu ile yine bir enjektör yardımıyla yıkandı. Tampondan geriye kalanlar ucu çekilmiş bir pastör pipeti kullanılarak vakumla alındı. Örnekler jele yüklendi ve kuyuların üst kısımlarına 1x SDS-PAGE yürütme tamponu eklendi.

2.4.5 Örneklerin Hazırlanması

Eppendorf tüplerine SDS-PAGE için ayrılmış örnekler, 20 µl 2x yükleme tamponu ile çözüldü. Eppendorf tüplerindeki örnekler (protein çözeltisi), vorteksle karıştırılıp, kısa bir çöktürmenin ardından 5 dakika boyunca 100°C de bekletildi. Isınan örnekler kuyucuklara otomatik pipet kullanılarak yerleştirildi.

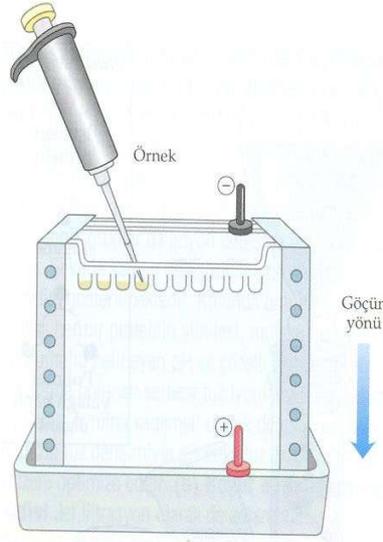
Belirteç için: 40µl BSA + 40µl 2x yükleme tamponu

Örnekler için: 40 Protein çözeltisi + 40µl 2x yükleme tamponu

Yükleme Tamponu

- 50 mM Tris-HCl, pH: 6.8, % 1 SDS,
- 2 mM EDTA,
- % 1 β -merkaptoetanol,
- % 10 gliserol,
- % 0.002 Bromofenol mavisi

2.4.6.Elektroforez



Şekil 2.4.1 Hazırlanan Örneklerin Kuyucuklara Yüklenmesi

Hazırlanan örnekler kuyucuklara yüklendikten sonra 1x SDS-PAGE yürütme tamponu ile doldurulmuş elektroforez tankı içine yerleştirildi. Örnekler, derişim jelindeyken 100 Voltta, ayırma jeline geçtikleri andan itibaren ise 120 voltta yürütüldü. Yürütme, yükleme tamponunda bulunan bromofenol mavisi ayırma jelinden çıktıktan sonra 20 dakika daha sürdürüldükten sonra durduruldu.

Ayırma jeli, sol üst kenarından küçük bir parça kesilerek işaretlendi ve ardından jel boyama çözeltisi içinde çalkalanarak iyice boyanana kadar bekletildi. Boyama işleminin ardından jel, arıtma çözeltisine alındı ve boyanın açılması sağlandı.

5x SDS-PAGE yürütme tamponu: 15 g Tris baz, 72 g Glisin ve 5 g SDS, distile su ile 1 litreye tamamlandı ve pH 8.3'e ayarlandı.

Boyama Çözeltisi: 100 ml % 10 asetik asit, 100 ml % 95'lik alkolde çözülmüş % 0.25 Coomassie mavisi ile hazırlandı.

Arıtma Çözeltisi: % 5 asetik asit, % 50 etanol ile hazırlandı.

2.5 Lüsiferaz Katlanma ve Termal Agregasyon Deneyleri

6 M'lık üre çözeltisi hazırlandı. Üre ile denatüre edilen lüsiferaz iki balık türünden ekstrakte edilen ve DEAE iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan Hsp70 ler ile seyreltilerek lüsiferaz test çözeltisinde renaturasyonu hesaplandı. Kör olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanıldı. Lüsiferaz kemilüminesans özelliği olduğu için katlanma oranı lüminometre (Biofix lumi-10 Macherey–Nagel luminometer) ile takip edildi (Tutar, 2006; Place ve Hofmann. 2001).

2.6 ATP Hidroliz Deneyleri

ATPaz reaksiyonu sonucunda substrat olan ATP'nin, ADP ve inorganik fosfata (Pi) parçalanmasıyla açığa çıkan Pi'nin kolorimetrik olarak molibdat çöktürmesiyle belirlenmesi esasına dayanan bu yöntem, Goldenberg ve Fernandez'e (1966) göre uygulandı.

Reaksiyonun birinci basamağını standart ATPaz reaksiyonu oluşturmaktadır. ATPaz reaksiyonunda, 50 mM Tris-Cl (pH 8,0), 400 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM ATP ve 10 µg/µl saf protein kullanıldı. Reaksiyon karışımından 0-40 dk zaman aralığında 5'er dakika aralıklarla ikinci basamak reaksiyon için 20 şer µl alındı.

Reaksiyonun ikinci basamağında ise, ATPaz reaksiyonu sonucu oluşan Pi'nin dolayısıyla ATPaz aktivitesinin belirlenmesidir. Birinci basamakta elde edilen reaksiyondan 20 µl alınarak 1,5 ml ependorf içerisinde 500 µl tampon 1 (litrede 100 g TCA, 10 g Tiyoüre, 30 g Mohr tuzu (ferrik amonyum sülfat = FAS·6H₂O)) eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Süre sonunda 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek süpernatant yeni bir tüpe alındı. Üzerine tampon 2 (200 ml'de 45 ml konsantre H₂SO₄, 22 g amonyum molibdat) eklendi ve karışım 1 saat boyunca oda sıcaklığında tutuldu. Süre sonunda, enzim içermeyen reaksiyon karşımı kör olarak kullanılarak fosfor standardı (5 mg/100 ml fosfor standardı olarak 0,2197 g/l KH₂PO₄)

ile birlikte OD₆₆₀ ölçümleri yapıldı. Proteinli ve proteinsiz reaksiyonlar arasındaki fark alınarak formülde yerine konuldu ve proteinin salıverdiği Pi miktarı, mg/100 ml olarak hesaplandı. Bu aynı zamanda enzimin ATP'yi parçalama değeri olarak alındı. Kullanılan formül aşağıda verilmiştir.

$$\text{mg/100 ml fosfor oluşumu} = \frac{\text{Reaksiyon farkının absorbanası}}{\text{Standart reaksiyonun absorbanası}} \times 5$$

2.7 *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa*'dan Saflaştırılan Hsp70 Proteininin Florimetre Spektroskopisi ile Denaturasyon Deneyleri

Cyprinion macrotomus ve *Garra rufa obtusa*'dan saflaştırılarak elde edilen Hsp70 protein çözeltilerinin 290 nm'de 300–500 floresans aralığında ve 5–5 nm yarık aralığında emisyon spektrumu alındı. Maksimum dalga boyu belirlendi.

9 M'lık üre çözeltisi hazırlandı. Üre, derişimi 0' dan başlayarak farklı üre ve nükleotit derişimlerinde proteinler titre edilerek floresan değeri elde edildi. Titrasyon eğrisinden katlanmış / katlanmamış protein oranları tespit edilerek serbest enerji değeri hesaplandı. Bu değeri üre derişiminin sıfır olduğu “y” eksenine ekstrapole edilerek proteinin termodinamik kararlılığı hesaplandı. Grafikten 1 ve 2 numaralı eşitlikler kullanılarak proteinlerin kararlılıkları hesaplandı. Daha sonra bu çözeltilere 0.95M'lık ADP (adenozin di fosfat) eklenip aynı şemler nükleotit varlığına tekrarlandı.

- $FU = (Y_F - Y) / (Y_F - Y_U)$ (1)

- $FF = (Y - Y_U) / (Y_F - Y_U)$ (2)

- FF = Katlanmış (başlangıçtaki) protein oranı
- FU = Katlanmamış (denature olmuş) protein oranı
- Y_F = Katlanmış proteinden kaynaklanan maksimum floresans
- Y = Denaturasyon eğrisinde herhangi bir nokta
- Y_U = Katlanmış proteinden kaynaklanan minimum floresans

Bu değeri denlerden aşağıdaki K (denge sabiti) her bir üre derişimi için hesaplandı.

- $K = FU / FF$ (3)

Son olarak da hesaplanan K değerlerinden ΔG değerleri hesaplandı.

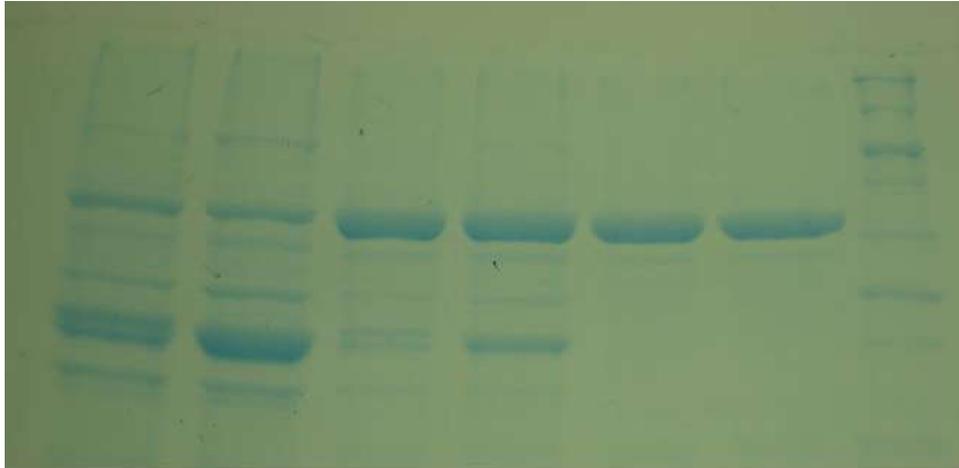
- $\Delta G = -RT \ln K$ (4)

Bu değerler $x = 0$ noktasına ekstrapole edilerek üresiz çözeltideki proteinin Gibbs serbest enerjisi hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1 Hsp70 Saflaştırılması

İki tür balığımızın beyaz kaslarından homojenize edilerek DEAE kolon kromatografisi kullanılarak ayrılan proteinlerin daha sonra UV- spektroskopisinde 280 nm dalga boyunda absorpsiyonları okundu. Yüksek değerli pikler veren fraksiyonlar BSA proteini ile birlikte poliakrilamid jele yüklendi (SDS-PAGE). Bu işlem *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa* için ayrı ayrı yapıldı. Hangi tüplerde Hsp proteini olduğu belirlenerek saflaştırma işlemi yapılmış oldu.



Şekil.3.1.2 Hsp70 saflaştırması SDS-PAGE jeli. Sağdaki tekli bantlar Hsp70 izolesini göstermektedir.

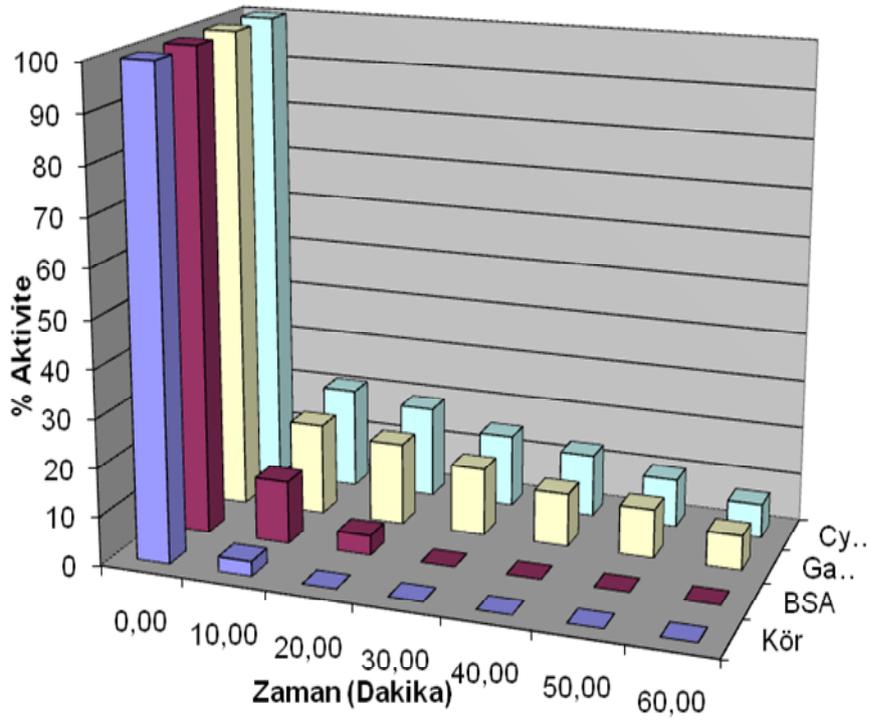
3.2 Lüsiferaz Katlanma ve Termal Aggregasyon Deneyleri

Üre ile denatüre edilen lusiferaz iki balık türünden ekstrakte edilen ve DEAE iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan Hsp70 ler ile seyreltilerek renaturasyonu hesaplanmıştır. Kör olarak Bovine Serum Albumin (BSA) kullanılmıştır. Hsp70

yapılarının denatüre lusiferazın katlanmasına yardımları diğer organizmalardaki homologları ile benzerlik göstermektedir (örneğin *S.cerevesiae*).

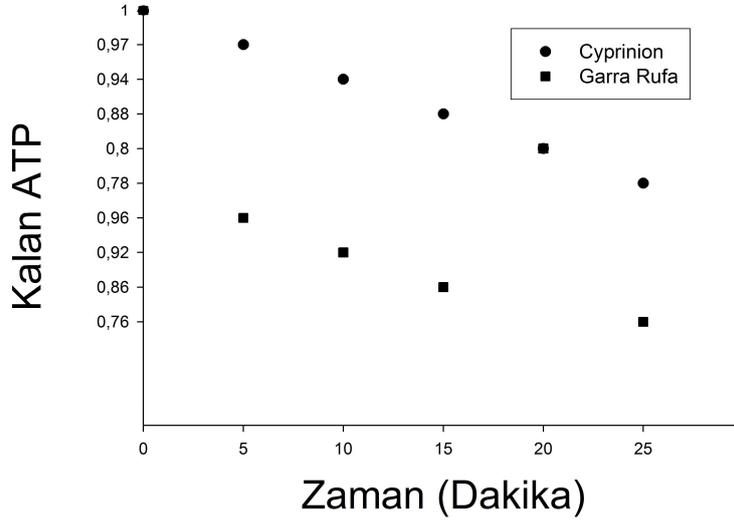
Çizelge.3.2.1 *Garra rufa obtusa* ve *Cyprinion macrotomus* 'dan saflaştırılan Hsp 70' in aktivitesinin zamanla değişimi

Zaman	Kör	BSA	Garra	Cyp
0,00	100	100	100	100
10,00	3	13	19	21
20,00	0	4	17	19
30,00	0	0	14	15
40,00	0	0	11	13
50,00	0	0	10	10
60,00	0	0	7	7



Şekil.3.2.1 İki balık türündeki Hsp70 proteinin zamana göre % aktivite grafiği

3.3 ATP Hidroliz Deneyleri



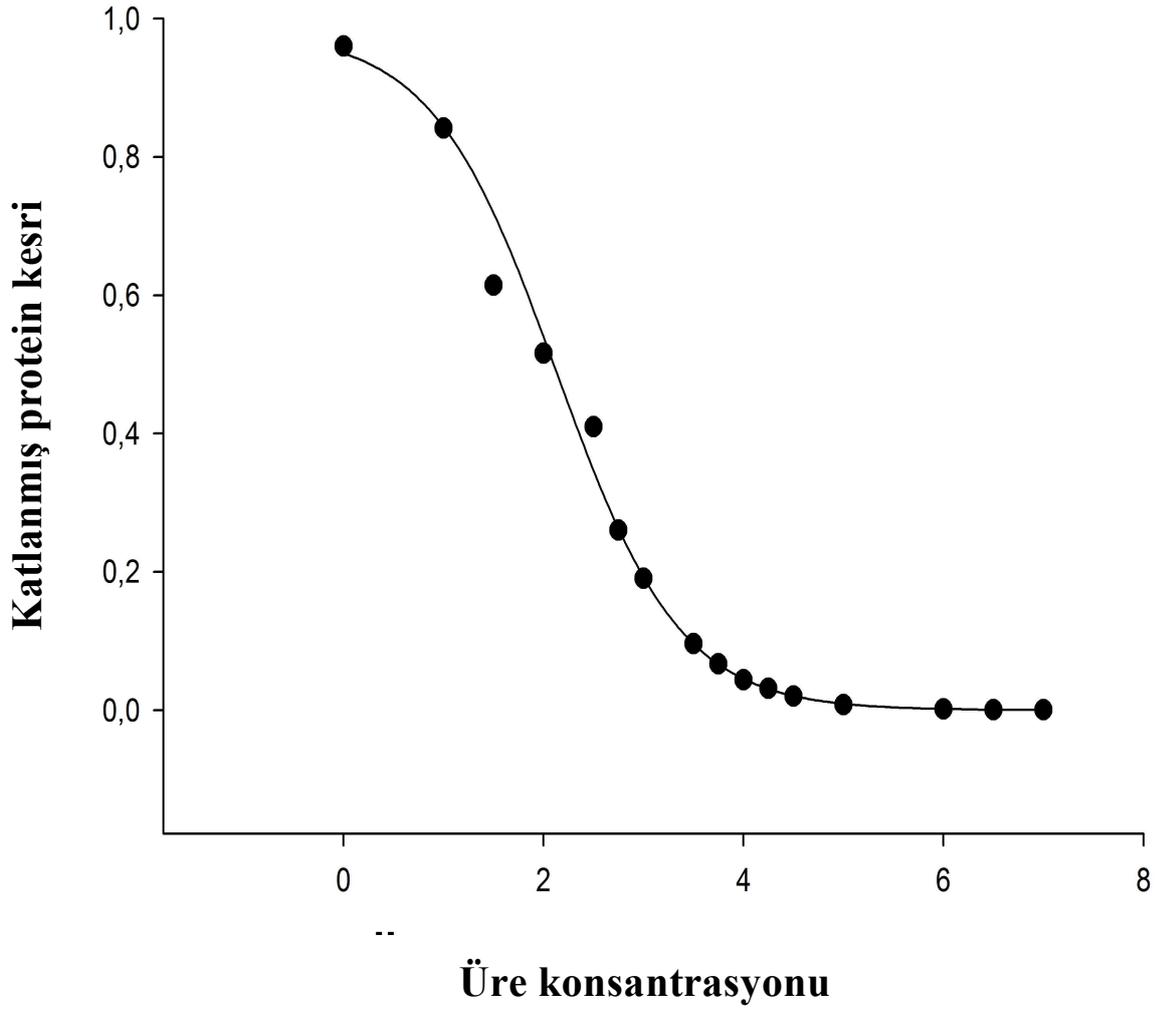
Şekil.3.3.1 *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa* Hsp70 'inin ATP hidrolizi sonucu zamana göre kalan ATP miktarı grafiği

3.4 *Cyprinion macrotomus* ve *Garra rufa obtusa*' dan Saflaştırılan Hsp70 Proteininin Florimetre Spektroskopisi ile Denaturasyon Deneyleri

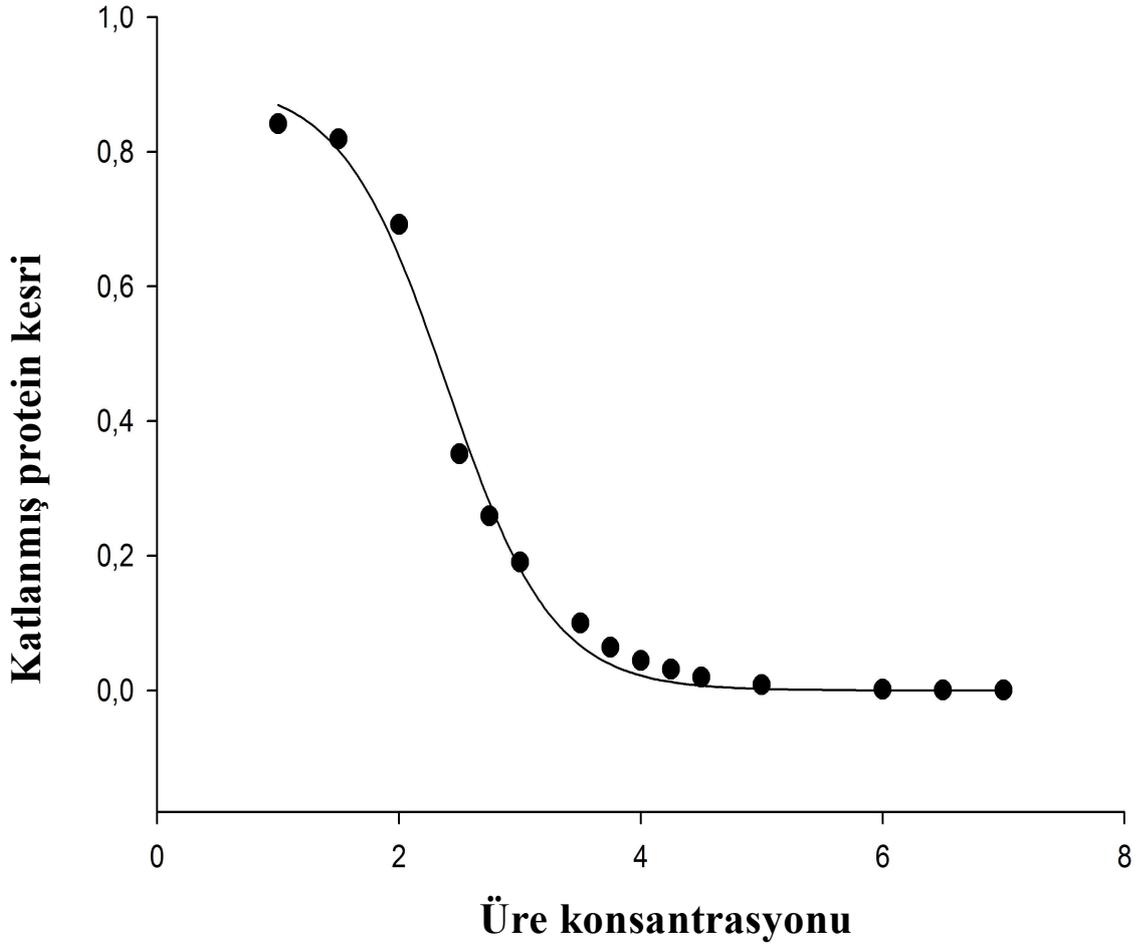
İki türe ait Hsp 70 proteinlerinin florimetre ile elde edilen spektrumlarından en yüksek floresans şiddetinin 338 nm olduğu tespit edilmiştir. Daha sonra bu dalga boyundaki floresans şiddetlerine karşın eklenen üre derişimleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 3.4.1, Şekil 3.4.2).

Bu grafikten konu 2.7 deki (1) ve (2) eşitlikleri kullanılarak bulunan değerler eşitlik (3) de yerine yazılarak eşitlik (4) de ki ΔG değeri hesaplandı.

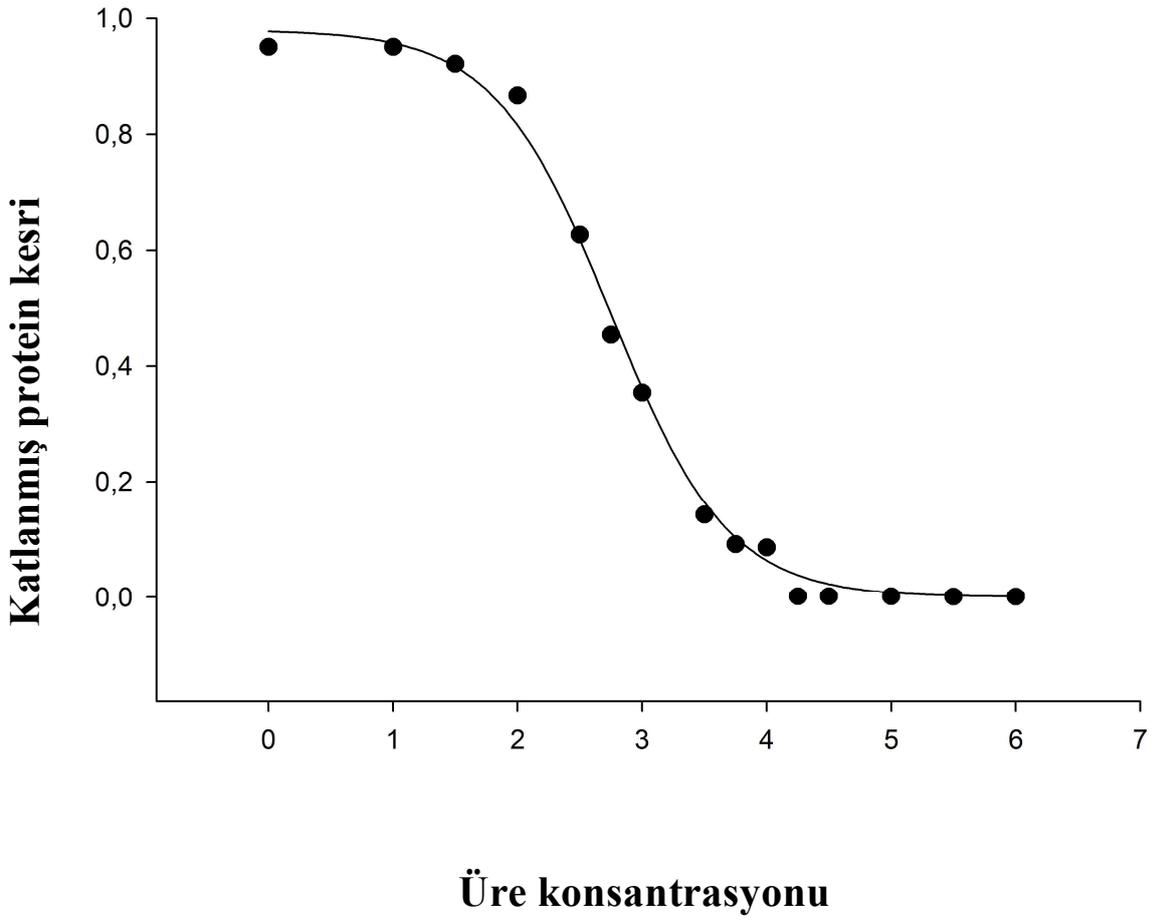
- *Cyprinion macrotomus* için Hsp70'in ΔG değeri $29,00 \text{ kJ mol}^{-1}$
- *Garra rufa obtusa* için Hsp70'in ΔG değeri $30,00 \text{ kJ mol}^{-1}$ olarak hesaplandı.
- Her iki türe ait ADP varlığındaki denaturasyon eğrileri, serbest enerjiyi 2 değer artırmaktadır.



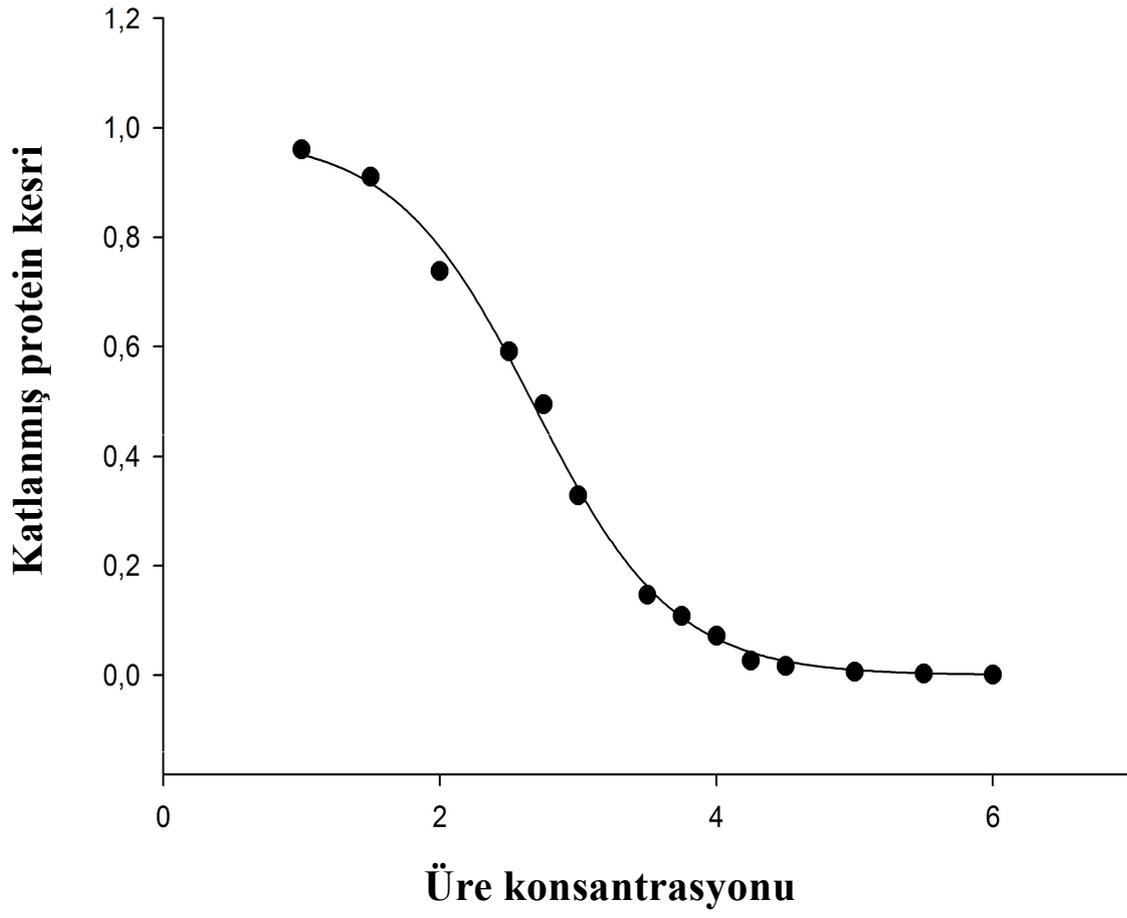
Şekil 3.4.1 *Cyprinion macrotomus* için Hsp70 denaturasyon eğrisi



Şekil 3.4.2 *Cyprinion macrotomus* için Hsp70 denaturasyon eğrisi (ADP varlığında)



Şekil 3.4.3 *Garra rufa obtusa* için Hsp70 denaturasyon eğrisi



Şekil 3.4.4 *Garra rufa obtusa* için Hsp70 denaturasyon eğrisi (ADP varlığında)

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hsp70 ler yeni sentezlenen ve denatüre olmuş proteinlerin doğal hale erişmesine, proteinleri agrege olmalarını engellemeye, agregatların çözünürlüğüne ve hücrede doğru katlanmayan proteinlerin degradasyonuna yardımcı olmaktadır. Hsp70 korunmuş büyük bir şaperon ailesini oluşturmakla birlikte çeşitli hücrel fonksiyonlarının yanında, polipeptitlerin kararlı konformasyona erişmesine de yardımcı olmaktadır. Hücre için hayati öneme sahip bu makromoleküller peptitlere bağlandıkları zaman ATP hidrolizlerini artırır ve peptidin üçüncül yapısını bulmasına yardım ederler. Aynı zamanda ATP hidrolizide peptide bağlanmayı artırır.

Balık organizmalarda stresi çalışmak için iyi bir modeldir. *Cyprinion macrotomus* (vurucu) ve *Garra rufa obtusa* (yalayıcı) Sivas balıklı Kaplıcada yaşayan iki Cyprinidae türüdür. Bu türler 40 °C ye varan sıcaklıklarda yaşarlar fakat normal yaşama sıcaklıkları en fazla 25 °C'a kadardır. Kaplıcada ortalama sıcaklık yıl boyunca 35 °C dir. Bu ortamda birçok zorluk, yüksek basınç, düşük oksijen miktarı, aşırı sıcaklık, besin kıtlığı, ağır metaller ve enfeksiyon sürekli fizyolojik stres oluşturur bu iki tür balık sayılan bu stres faktörlerinden sürekli etkilenmesine rağmen hayatta kalmaları iyi bir model olacağı sonucunu bize vermektedir.

Balıklı çermikteki iki tür balıktan Hsp70 proteini saflaştırılmış ve biyokimyasal özellikleri incelenmiştir.

Hsp70 proteinlerinin kararlılıkları yaklaşık 30 kJ/mol olarak tespit edilmiştir. Bu proteinlerin substrat proteinleri katlamaları üre ile denatüre edilen lüsiferazı katlaması ölçülerek belirlenmiştir. Elde edilen değerler diğer türlere oldukça yakındır. Dolayısı ile benzer bir mekanizma bu çalışmadaki organizmalar içinde geçerlidir. Bu çalışmanın devamı olan deneylerde balıkların yaşadığı ortamdaki selenyum miktarının antioksidan enzimleri ve Hsp70 miktarını artırdığı gözlemlenmiştir. Hsp70 miktarındaki artış balıkların strese dayanıklılığını açıklamaktadır. Hsp70 proteinleri yalnız çalışmazlar ve yardımcı (koşaperon) proteinlerine ihtiyaç duyarlar. Bu proteinlerin yardımı ile oldukça fazla substrat proteini doğal konformasyonlarına ulaştırırlar. Bu çalışma Hsp70 ile sınırlandırılmış olup Hsp70 in substrat katlama özelliğine lüsiferaz kullanılarak

bakılmıştır ve ayrıca ATP hidrolizine sıcaklıktan etkilenmeyen ve fosfata bağı bir mekanizma kullanılarak bakılmıştır.

Yapılan deneyler balıkların sıcaklık, oksijen eksikliği, besin eksikliği, yüksek basınç streslerine selenyum bağı Hsp70 ifadesi ve antioksidan enzimlerinin aktivitelerinin artırması ile karşı geldiğı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Al – Habib, O.A.M., Al – Habib, W.M.S. (1979). Acclimation to Temperature and Death at High Changing Lethal Temperatures in Cyprinion macrostomus (Heckel). *J.Therm. Biol.*, 4 (1), 75 – 77.
- Banik, U., Saha R.j Mandal, N.C, Bhattacharyya, B., ve Roy, S. (1992). *Eur.J. Biochem.* 206, 15–21
- Bardwell, J. C. A. & Craig, E. A. (1987). Eucaryotic *M*, 83000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*, *Proc. Nutl Acad. Sci. USA* 81, 848–852.
- Baykal Y, Gök F, Kocabalkan F. (2000). Isı Şok Proteinleri ve Hastalıklardaki Rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri*20(3);187-194.
- Boyer, R.F. (1993). *Modern Experimental Biochemistry*, 2nd Ed, The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc., California., pp 75-80.
- Briolay, J., Galtier, N., Brito R.M. ve Bouvet, Y. (1998). Molecular phylogeny of Cyprinidae Inferred from *Cytochrome b* DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 9, 100-108.
- Brito R.M., Briolay , J., Galtier, N., Bouvet, Y. ve Coelho, M.M. (1997). Phylogenetic Relationships within Genus *Leuciscus* (Pisces, Cyprinidae) in Portuguese Freshwater, Based on Mitochondrial DNA *Cytochrome b* Sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8, 435-442.
- Brown, M.E. (1957). *The Physiology of Fishes*, Vol: 1 Academic Press, New York and London,
- Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossman, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J. & Rothman, J. E. (1986). Uncoating ATPase is a Member of the 70 Kilodalton family of Stress Proteins, *Cell* 45, 3-13.
- Cheng, M. Y., Hartl, F. U., Martin, J., Pollock, R. A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E. M., Hallberg, R. L. & Horwich, A. L. (1989). Mitochondrial Heat-Hhock Hrotein hsp60 is Essential for Assembly of Proteins İmported into Yeast Mitochondria, *Nature* 337, 620-625.
- Ciocca, DR, Calder wood, SK. (2005). Heat Shock Proteins in Cancer: Diagnostic, Prognostic, predictive and Treatment İmplications. *Cell Stress & Chaperones*, 10 (2): 86 -103.
- Clark JI, Muchowski PJ. (2000). Small Heat Shock Proteins and Their Potential Rolehz
- Cristoph Aufricht (2005). Heat-shock protein 70: moleculer supertool? *Pediatr Nephrol*; 20:707-713
- Çelebi, G. (2000). *Biyofizik. Faküllteler Kitapevi*, 2 Baskı. İzmir, 64-67.
- Demir N. (2009). *İhtiyoloji. Nobel Yayın Dağıtım*, 4. Baskı, Ankara 121-333
- Deuerling E, Schulze-Specking A, Tomoyasu T, Mogk A, Bukau B. (1999). Trigger Factor and DnaK Cooperate in Folding of Newly Synthesized Proteins.
- Durand J. D., Ünlü, E., Doadrio, I., Pipoyan, S ve Templeton, A.R. (2000). Origin, radiation, dispersion and allopatric hybridization in the chub *Leuciscus cephalus*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 267, 1687-1697.
- Durand, J.D., Tsigenopoulos, C.S., Ünlü, E. and Berrebis, P. (2002). Phylogeny and Biogeography of the Family Cyprinidae in the Middle East inferred from *Cytochrome b* DNA-evolutionary Significance of this Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol.22, No.1, January, pp. 91-100.

- Ellis RJ, Van Der Vies SM. (1991). Molecular Chaperones. *Ann Rev Biochem*; 60:321-347.
- Ergene Gözükar, S. ve Çavas, T. (2001). "Cytogenetic Analysis of *Garra Rufa* (Heckel, 1843) from Eastern Mediterranean River Systems", Third European Cytogenetics Conference 1(73):43.
- Geldiay, R ve Balık, S. (1988). *Türkiye Tatlı Su Balıkları*", Ege Üniversitesi Basım evi, Bornova-İzmir. Turkey.
- Geldiay, R. ve Balık, S. (1996). "Türkiye Tatlı Su Balıkları", Ege Üniversitesi Basım Evi, Bornova-İzmir, 532s.
- George, N. ve Jr. Philips. (1997). Structure and Dynamics of Green Fluorescent Protein. *Current Opinion in Structured Biology*. 7:821-827.
- Gilles, A., Lecointre, G., Faure, E., Chappaz, R., and Brun, G. (1998). Mitochondrial Phylogeny of the European Cyprinids: Implications for their Systematics, Reticulate Evolution and Colonization Time *Mol. Phylogenet. Evol* 10, 132-143.
- Gitelson, I. I. ve L. A. Levin. (1999). Bioluminescence in Oceanology. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*. 4: 1, 555-562.
- Goldenberg, H. & Fernandez, A. (1966). Simplified Method for the Estimation of Inorganic Phosphorus in Body Fluids. *Clin. Chem*. 12: 871-876.
- Guner, Z. (1979). *Fizik 1*. Ankara Üniversitesi Basımevi, 2. Baskı, Ankara, 271-274
- Haddock, S. H. D., C. M. Me Dougall. and J. F. Case. (2000). "The Bioluminescence Web Page" <http://lifesci.ucsb.edu/~biolum/>
- Hastings, J.W. (1983). Biological Diversity, Chemical Mechanisms, and Evolutionary Origins of Bioluminescent Systems. *Journal of Molecular Evolution*. 19: 5, 309-321
- Hastings, J.W. (1996). Chemistry and Color of Bioluminescent Reactions: a review, *Gene*, 173:1,5-11.
- Herring, P. J. 1987. Systematic Distribution of Bioluminescence in Living Organisms. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 1: 3, 147-163.
- Howes G. J. (1982). Anatomy and Evolution of the Jaws in the Semiplotine Carps with a Review of the Genus *Cyprinion* Heckel, 1843 (Teleostei: Cyprinidae). *Bull. Br. Mus. (Nat. Hist.)Zool*. 42.299-335.
- <http://banditosbanditosbanditos.typepad.com/weblog/2007/06/index.html>
- http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/full_text-tr_1706.html
- [http://www.akvaryum.com/forum/doktor,kangal_baligi\(gar_k313539.asp](http://www.akvaryum.com/forum/doktor,kangal_baligi(gar_k313539.asp) Ege Üni, İzmir, 272s.
- <http://www.cs.stedwars.edu/chem/Chemistry/Chem43/Chem43/HSP/Structure>. *Erişim Tarihi*: 03.03.2006.
- <http://www.cumhuriyet.edu.tr/sivas/sivas05.html>
- http://www.psoriasisfishcure.com/researches/doctor_fish.htm
- <http://www.sivasinternet.net/>
- Johnstone, A., Thorpe, R. (1982). *Immunochemistry in Practice*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 9-16.
- Jones, K., F. Hibbert. and M. Keenan. (1999). Glowing jellyfish, bioluminescence and molecule called coelenterazine, *Trends in Biotechnology*. 17: 12,477-481.
- Kuru, M. (1971). "Freshwater Fishes Fauna of Eastern Anatolia", *Istanbul Üniversitesi Fen Fak. Mec. Seri B*, 36 (3-4): 137-147.
- Kuru, M. (1979). "Freshwater Fishes of South-Eastern Turkey 2 (Euphrates-Tigris System)" *Hacettepe Bulletin of Natural Science and Engineering*, 7-8: 105-114.
- Laad AD, Thomas ML, Fasih AR, Chiplunkar SV. (1999). Human Gamma Delta T Cells Recognize Heat Shock Protein-60 on Oral Tumor Cells. *Int J Cancer*, 80 (5), 709-714.

- Landry J. (1998). Protein Interactions and Moleküler Chaperones. *Erişim adresi:* <http://www.tulane.edu/~biochem/med/hsp.htm>.
- Machordom, A. and Daodrio, I. (2001). Evidence of a Cenozoic Betic –Kabilian Connection Based on Freshwater Fishphylogeography (Luciobarbus, Cyprinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2): 252-263.
- Mann, C.J.Rayer, C.A. ve Malthews, C.R. (1993). *Prot. Sci.*2, 1853–1861
- Mantsch, H., H., Perczel, A., Hollosi, M. ve Fasman, G.D. (1993). *Biopolymers* 33, 201-207
- Mayer MP, Bukau B. (2005). Hsp70 chaperones: Cellular Functions and Molecular Mechanism. *Cell Mol Life Sci.*;62:670–684
- Mayer MP, Schroder H, Rudiger S, Paal K, Laufen T, Bukau B. (2000). Multistep Mechanism of Substrate Binding Determines Chaperone Activity of Hsp70. *Nat Struct Biol.* (7):586–93.
- Menoret A, Chaillot D, Callahan M, JacQuin C. (2002). Hsp 70, an Immunological Actor Playing with the Intracellular Self Under Oxidative Stress. *Int J Hyperthermia* 18(6);490-505.
- Milani V, Noessner E, Ghose S, Kuppner M, Ahrens B, Scharner A, Gastpar R. (2002). Heat Shock Protein 70: Role in Antigen Presentation and Immüne Stimülasyon. *Int J Hyperthermia*;18(6);563-565.
- Moseley P. (2006). Stress Proteins and the Immune Response. *Erişim adresi:* www.elsevier.com/locate/immpharm.
- Newnam GP, Wegrzyn RD, Lindquist SL, Chernoff YO. (1999). Antagonistic Interactions between Yeast Chaperones Hsp104 and Hsp70 in Prion Curing. *Mol Cell Biol* 19: 1325–1333
- Nollen EA, Brunsting JF, Roelofsen H, Weber L A, Kampinga HH. (1999). In Vivo Chaperone Activity of Heat Shock Protein 70 and Thermotolerance. *Mol Cell Biol*, 19 (3): 2069-2079.
- Ostberg JR, Kaplan KC, Repasky EA. (2002). Induction of Stress Proteins in a Panel of Mouse Tissues by Fever-range Whole Body Hyperthermia. *Int J Hyperthermia*, 18(6);552-562.
- Özer Z, Akpınar M.A., Akçay A., Erdem Ü, Güler R., Yanıkoğlu A., Ergenoğlu B., Ünal Ş., Savaşçı Ş. (1987). Kangal Balıklı Kaplıcanın Bazı Kimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması. *C.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 5. Cilt Ek Sayısı.
- Pehlivan F. (1997). *Biyofizik. Hacettepe- Tas. Kitapçılık*. 2. Baskı, Ankara, 365-366.
- Peterson, EA, Sober, H. A. (1956). Chromatography of Proteins. I. Cellulose Ion-Exchange Adsorbents. *J. Amer. chem.*
- Pharmacia Fine Chemicals AB. (1980). *Ion Exchange Chromatography: Principles And Methods*, Rahmsi Lund, Sweden, pp 4-8.
- Place SP, Hofmann GE. (2001). Temperature Interactions of the Molecular Chaperone Hsc70 from the Eurythermal Marine Goby *Gillichthys Mirabilis*. *J Exp Biol.* Aug; 204 (Pt 15):2675-82.
- Pockley AG. (2001). Heat Shock Proteins in Health and Disease: Therapeutic agents? *Erişim adresi:* <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>.
- Reichl, S., J. Arnold., J. Knight., J. Schiller. and K. Arnold. (2000). Reaction of Pholasin with Peroxidases and Hypochlorous Acid. *Free Radical Biology and Medicine*. 28: 10, 1555-1563.
- Ritossa F. (1962). A New Puffing Pattern Induced by Temperature Shock and DNP in *Drosophila*; *Experientia*
- Rylander MN, Feng Y, Bass J, Diller KR. (2005). Thermally Induced Injury Heat-Shock Protein Expression in Cells and Tissues. *Ann N Y Acad Sci*;1066;222-242.

- Sean, P., Place ve Gretchen, E. (2001). Tempature Interactions The Molecular Cahperone Hsc70 from The Eurytherml Marine Goby Gillichthys Mirabilis, Department Biology, Arizona State Universty, Tepme, AZ, USA 85287-1501.
- Szabo, A.G., Stepanik, T.M., Wayner, D.M., and Young, N.m. (1985) Biophys.J.41,233-244
- Telefoncu, A. (1996). Protein Saflaştırılması ve Karakterizasyonu.
- Terzioğlu E. (1999). Isı şoku proteinleri. Gümüşdiş G, Doğanavşargil E (Ed.): Klinik Romatoloji.Deniz Matbaası,İstanbul,;51-53.
- Tsigenopoulos C.S., and Berberi, P. (2000). Molucular Phylogeny of North Mediterranean Freshwater Barbs (*genus Barbus*: Cyprinidae) Inferred from Cytochrome Bsuquences: Biogeographic and Systematic Implications. Molecular Phylogenetics and Evolution, 14(2):165-179.
- Tutar Y. (2006). Heat Shock Proteins, Substrate Specificity and Modulation of Function. *Protein Pept Lett.*13(7):699-705.
- Tutar Y. (2006). Key Residues Involved in Hsp70 Regulatory Activity and Affect of Co-chaperones on Mechanism of Action. *Protein Pept Lett.*;13(7):693-8.
- Undar, L., Akpınar, M. A and Yanıkoğlu, A. (1990). Where Doctor Fish Lick Disease, Hospital Doctor. Vol: C. 10 19, 28.
- Wang W, Basia Sho seyov VO, Altman A, (2004). Role of Plant Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones in the Abiotic Stress Respons e. *Trends in Plant Science*, 9 (5): 2 44-252.
- Yıldırım , H. (1985). Biyofizik. Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 431-433,
- Yıldız A., Genç Ö., Bektaş S.,Enstrümental Analiz Yöntemleri,Hacettepe Üniversitesi Yayınları A 64,Ankara,1993
- Zardoya, R., Economidis, P.S., ve Doadrio, I. (1999). Phylogenetics Relationships of Grek Cyprinidae: Molecular Evidence for at Least Two Origins of the Grek Cyprinid fauna. *Mol. Phylogenet. Evol* 13: 122-131.

EK-1



T.C.
SİVAS İL ÖZEL İDARESİ
İnsan Kaynakları ve Eğitim Müdürlüğü

Sayı : M.58.0.İÖİ.0.71.00.00/ 1563-2814
Konu : Balıklı Kaplıcadaki balıklar.

05/05/2008

VALİLİK MAKAMINA

Cumhuriyet Üniversitesi Rektörlüğünün 02.05.2008 tarih ve B.30.2.CUM.0.70.00.00/658-1618 sayılı yazılarıyla, Üniversitenin Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyesi Yrd.Doç.Dr. Yusuf TUTAR'ın "Cyprinidae Ailesi Aging (Yaşlanma) ve Nörodejeneratif Hastalık İçin Model Olarak Kullanılması" başlıklı projesi için Kangal İlçesi Balıklı Kaplıca'daki balıkları kullanarak çalışabilmesi gerektiği bildirilerek, gerekli izin verilmesi istenilmektedir.

Belirtilen proje için, Kangal İlçesi Balıklı Kaplıca'daki balıkları kullanarak çalışma yapılabilmesi konusunda gerekli izin verilmesini;

Olurlarınıza arz ederim.


Mahmut KAYHAN
Genel Sekreter


05/05/2008
Veysel DALMAZ
Vali

Adres : Akdeğirmen mh. M. Akif Ersoy Cad.-58040/SİVAS
Web Adresi : www.sivasilozelidaresi.gov.tr

Tel: 0(346)223 01 16 FAKS: 224 79 80
e-mail : sivas@sivasilozelidaresi.gov.tr

EK-2

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
DENEY HAYVANLARI
ETİK KURULU

Sayı : :B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/241
Konu : Hayvan Etik Kurul Hk.

01/05/2008

Sayın Yrd. Doç.Dr. Yusuf TUTAR

FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA ;

01/05/2008 tarih ve 123 sayılı "Cyprinidae ailesi balıklarının aging (yaşlanma) ve nörodejeneratif hastalıklar için model olarak kullanılması" isimli Grup Araştırma Projesi Etik Kurulumuzca uygun bulunmuştur.

Prof.Dr. Erol SEZER (üye)



Doç.Dr. Mustafa GÜRELİK (üye)

- Kalmadı

Doç.Dr. Taner ERSELCAN (üye)

Kalmadı

Prof.Dr. Eray BULUT (üye)



Yrd.Doç.Dr.Ersin TUNCER (üye)

İzini

Doç.Dr. Sinan GÜRSOY (üye)



Yrd.Doç.Dr. İhsan HUBBEZOĞLU (üye)

- İ. Hubbezoğlu

Yrd.Doç.Dr. Yavuz SİLİĞ (üye)



Uzm.Vet.Dr.Yücel YALMAN(Başkan Yrd.)



Prof.Dr. M.Kemal YILDIRIM (Başkan)



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı Şule (Okan) Bozkale

Doğum Yeri ve Tarihi Sivas, 07/04/1984

Medeni Hali Evli

Yabancı Dil İngilizce

E-posta Adresi okansule@hotmail.com

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise Kongre Lisesi Sivas 1998-2001

Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,
Kimya Bölümü, 2003-2007

Y. Lisans Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
Biyokimya Anabilim Dalı 2007-2010